Spektraluntersuchungen von nativem und denaturiertem C-Phycoerythrin und dessen Untereinheiten aus dem Cyanobacterium Pseudanabaena W 1173.
Die Rolle der Chromophore bei der Energieübertragung

Barbara Zickendraht-Wendelstadt

1980

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Spektraluntersuchungen von nativem und denaturiertem C-Phycoerythrin und dessen Untereinheiten aus dem Cyanobacterium Pseudanabaena W 1173. Die Rolle der Chromophore bei der Energieübertragung

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

des

Fachbereiches Biologie

der

Ludwig-Maximilians-Universität

München

vorgelegt

von

Barbara Zickendraht-Wendelstadt

aus

Bienenbüttel

1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Berichterstatter: Prof.Dr.W.Rüdiger

2. Berichterstatter: Dr.H.Scheer

Tag der mündlichen Prüfung: 10.1.1980

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Prof.Dr.W.Rüdiger am Botanischen Institut der Universität München angefertigt. Allen, die mir dabei geholfen haben, danke ich sehr herzlich, besonders Herrn Prof.Dr.W.Rüdiger für seine freundliche Unterstützung und stete Diskussionsbereitschaft.

Ein Teil der Fluoreszenzmessungen wurde am Institut für Physikalische Chemie II der Technischen Universität München durchgeführt.
Herrn Prof.Dr.F.Dörr, besonders auch Herrn Dr.J.Friedrich und Herrn Dipl.Phys.G.Flatscher sei herzlich gedankt für die vielen Anregungen und die gute Zusammenarbeit.

Zu danken habe ich auch Herrn Prof.Dr.B.Linzen und Frau Dr.R.Loewe vom Zoologischen Institut der Universität München sowie Herrn Prof.Dr.H.Wolter für ihre Hilfestellungen.

Fräulein Annemarie Sichler half zeitweilig bei der Algenanzucht und Isolierung des C-Phycoerythrins.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die gewährte finanzielle Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung und Problemstellung	1
1.1.	Vorkommen von Biliproteiden	1
1.2.	Funktion und Lokalisation	2
1.3.	Chemische Natur	3
1.4.	Aufgaben und Problemstellung	4
2.	Isolierung, Reinigung und Charakterisierung des C-Phycoerythrins und der α- und ß-Untereinheiten	6
2.1.	Anzucht und Ernte der Algen	6
2.2.	Isolierung und Reinigung des C-Phycoerythrins	6
2.3.	Reinheitskriterien	7
2.3.1.	Disk-Gelelektrophorese	7
2.3.2.	SDS-Gelelektrophorese	8
2.3.3.	Absorptionsspektren, Reinheitsgrad und spezifischer Extinktionskoeffizient	10
2.4.	Präparative Isolierung der Untereinheiten	12
2.5.	Identifizierung und Charakterisierung der renaturierten Untereinheiten	13
2.5.1.	SDS-Gelelektrophorese	13
2.5.2.	Absorptionsspektren	14
2.5.3.	Bestimmung der molaren Extinktionskoeffizienten	17
2.5.4.	Bestimmung der isoelektrischen Punkte	17
2.6.	Bestimmung der absoluten Fluoreszenzquantenausbeuten	20
2.7.	Bestimmung der nativen Molekulargewichte	23
2.7.1.	Gelchromatographie	23
2.7.2.	Sedimentationsgleichgewichtsanalyse	25
2.7.3.	Bestimmung der Sedimentationskoeffizienten	26

Seite

3. Untersuchungen zur Energiewanderung im C-Phycoerythrin und in den renaturierten Untereinheiten 29

3.1. Fluoreszenzpolarisation 29
3.2. Depolarisationsmechanismen 30
3.3. Theorie zur Energiewanderung 32
3.4. Ergebnisse 35
3.4.1. Polarisationsgradspektren der Fluoreszenzanregung 35
3.4.2. Polarisationsgradspektren der Fluoreszenzemission 40
3.4.3. Fluoreszenzemissionsspektren 41
3.4.4. Fluoreszenzquantenausbeute als Funktion der Erregerwellenlänge 45
3.4.5. Fluoreszenzerregerspektren 45
3.5. Diskussion 48

4. Untersuchungen zur Proteindenaturierung im C-Phycoerythrin 57

4.1. Proteinfaltung und -entfaltung 57
4.2. Proteindenaturierung durch pH-Änderung 58
4.2.1. Absorption 59
4.2.2. Sedimentationskonstanten 62
4.2.3. Fluoreszenz 63
4.3. Proteindenaturierung mit Harnstoff 65
4.3.1. Absorption 66
4.3.2. Sedimentationskonstanten 70
4.3.3. Fluoreszenz 71
4.3.4. Renaturierung 74
4.4. Proteindenaturierung durch Temperaturerhöhung 75
4.4.1. Absorption 75
4.4.2. Sedimentationskonstanten 77
4.4.3. Fluoreszenz 79
4.5. Diskussion 80
4.6. Oxidationsreaktionen des C-Phycoerythrins 82
4.6.1. Oxidation mit Kaliumhexacyanoferrat-III 83
4.6.2. Trypsinabbau von oxidiertem C-Phycoerythrin 86

Seite

4.6.3. Oxidation mit Benzochinon 87

5. Zusammenfassung der Ergebnisse 89

6. Experimenteller Teil 93

6.1. Algenanzucht 93
6.1.1. Stammkulturen 93
6.1.2. Kolbenkulturen 93
6.1.3. Flaschenkulturen 93
6.1.4. Tonnenkulturen 94
6.1.5. Erntebedingungen 95
6.1.6. Nährmedium 95
6.1.7. Geräte und Sterilisation 96
6.2. Isolierung und Reinigung vom C-Phycoerythrin 96
6.2.1. Herstellung des Rohextraktes 96
6.2.2. Gelfiltration mit Sephadex G-100 97
6.2.3. Ionenaustauschchromatographie mit DEAE-Cellulose 98
6.3. Reinheitskriterien 98
6.3.1. Disk-Gelelektrophorese 98
6.3.2. SDS-Gelelektrophorese 99
6.4. Isoelektrische Fokussierung 101
6.5. Absorptionsspektren und molarer Extinktionskoeffizient 103
6.6. Präparative Isolierung der Untereinheiten 103
6.7. Molekulargewichtsbestimmungen 104
6.7.1. Gelchromatographie 104
6.7.2. Analytische Ultrazentrifugation 104
6.8. Fluoreszenzmessungen 107
6.8.1. Fluoreszenzspektren 107
6.8.2. Polarisationsgradspektren 107
6.8.3. Tieftemperaturspektren 108
6.9. Proteindenaturierung 109
6.9.1. Denaturierung durch pH-Änderung 109
6.9.2. Denaturierung mit Harnstoff 109
6.9.3. Denaturierung durch Temperaturerhöhung 109

	Seite
6.10. Oxidationsreaktionen	110
6.10.1. mit Jodlösung	110
6.10.2. mit Cer-IV-sulfat	110
6.10.3. mit Kaliumhexacyanoferrat-(III)	110
6.10.4. mit Benzochinon	110
6.11. Trypsinabbau	110
Literaturverzeichnis	111

Abkürzungen

PE	Phycoerythrin
PC	Phycocyanin
APC	Allophycocyanin
PEB	Phycoerythrobilin
SDS	Natriumdodecylsulfat
Temed	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamine
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
BPB	Bromphenolblau
I	Ionenstärke
S	Sedimentationskoeffizient
K	Grad Kelvin
C.R.	counting rate
E	Extinktion
UV	Ultraviolett

1. Einleitung und Problemstellung

1.1. Vorkommen von Biliproteiden

Biliproteide sind Pigmente, die in Cyanobakterien (Blaualgen), Rhodophyta (Rotalgen) und Cryptophyta vorkommen. Bei den Biliproteiden unterscheidet man drei verschiedene Pigmenttypen, das rote Phycoerythrin, das blaue Phycocyanin und das blaugrüne Allophycocyanin. Die einzelnen Pigmente unterscheiden sich je nachdem aus welcher Algenspecies sie isoliert werden. So gibt es zum Beispiel das C-Phycoerythrin, das in Cyanobakterien vorkommt und sich vom R- und B-Phycoerythrin aus Rotalgen bzw. vom Phycoerythrin aus Cryptophyceaen spektral unterscheidet.
Während die Phycoerythrine eine größere Variation aufweisen, sind die Phycocyanine und Allophycocyanine einheitlicher. Eine Klassifizierung wurde anhand der Absorptionsspektren und der Taxonomie vorgenommen.
In den letzten Jahren wurden zunehmend Biliproteide gefunden, die sowohl rote wie blaue Chromophore enthalten. So fand Bryant et al. (1976) Phycoerythrocyanin, Glazer et al. (1976, Glazer, Hixson 1975) ein R-Phycocyanin und in einigen Cryptophyceaen wurde ein Phycocyanin mit einem roten Chromophor gefunden, dessen Struktur bisher noch nicht aufgeklärt wurde (Song et al. 1979, Mörschel, Wehrmeyer 1975). Eine Übersicht über die verschiedenen Biliproteide und Chromophortypen ist in folgenden Arbeiten gegeben: Rüdiger (1975), Glazer (1977), Glazer (1976), O'Carra und O'hEocha (1976).

Der Gehalt an Biliproteiden variiert je nach Algenspecies und zum Teil auch je nach Wachstumsbedingungen (chromatische Adaptation, Bogorad 1975). Während Phycoerythrin in verschiedenen Algenarten ganz fehlt, ist Phycocyanin in Blaualgen und Allophycocyanin in Rot- und Blaualgen immer vorhanden.

1.2. Lokalisation und Funktion

Auch in der Lokalisation unterscheiden sich die Biliproteide. Während die Pigmente bei Rot- und Blaualgen in diskreten morphologischen Einheiten, in den sogenannten Phycobilisomen lokalisiert sind, sind sie bei den Cryptophyceaen im Stroma der Thylakoidmembran verteilt (Gantt et al. 1971). Phycobilisomen sind kugelförmige bzw. stangenförmige Polyaggregate, die auf der Oberfläche der Thylakoidmembran aufgereiht sind. Der Aufbau der Phycobilisomen ist bisher erst für einige Blau- und Rotalgen aufgeklärt worden. Als allgemeines Bauprinzip gilt jedoch eine schalenförmige Anordnung der Biliproteide in der Reihenfolge Phycoerythrin - Phycocyanin - Allophycocyanin von außen nach innen (Gantt, Lipschultz 1972, 1974; Gray et al. 1973; Gantt 1975; Koller et al. 1978). Auf diese Weise ist das Allophycocyanin räumlich dem Chlorophyll, welches in der Thylakoidmembran lokalisiert ist, am nächsten.
In Phycobilisomen von Cyanobakterien wurden auch farblose Proteine gefunden, deren Funktion bisher noch unklar ist (Tandeau de Marsac, Cohen-Bazire 1977; Yamanaka et al. 1978).
Der strukturelle Aufbau der Phycobilisomen ist eng mit der Funktion der Biliproteide verbunden. Schon in den frühen fünfziger Jahren konnte der Zusammenhang mit der Photosynthese nachgewiesen werden (Duysens 1951). Aktionsspektren (Haxo, Blinks 1950; Goedheer 1965) zeigten, daß das von diesen Farbstoffen absorbierte Licht im Photosynthesesystem II verwendet wird.
Mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen konnte bewiesen werden, daß die Anregungsenergie in einem strahlungslosen Energietransferprozeß (Förster Mechanismus) zum Chlorophyll transferiert wird. Die Effektivität liegt dabei zwischen 90 und 99 % (Tomita, Rabinowitch 1962; Porter et al. 1978; Searle et al. 1978).
Für Phycobilisomen und intakte Algenzellen wurde dabei ein Weg vom Phycoerythrin über Phycocyanin zum Allophycocyanin und vom Allophycocyanin zum Chlorophyll a nachgewiesen (Porter et al. 1978; Searle et al. 1978; Grabowski, Gantt 1978 a und b).
Einige Autoren fanden in letzter Zeit auch eine direkte Energieübertragung vom Phycocyanin zum Chlorophyll unter Umgehung des Allophycocyanins (Csatorday et al. 1978).

Wegen ihrer Funktion werden die Biliproteide auch als Lichtsammler- oder Antennenpigmente bezeichnet.
Die Ausbildung dieser Pigmente bedeutet für die Algen eine physiologische Anpassung an ungünstige Lichtverhältnisse. Während das Chlorophyll nur in einem geringen Spektralbereich (um 660 und 420 nm) des sichtbaren Lichtes absorbiert, kann mit Hilfe dieser Pigmente nahezu der gesamte Spektralbereich ausgenutzt werden. Das ist besonders in tiefen Wasserschichten und an schattigen Standorten von Vorteil, wo schon ein großer Anteil des Rotlichts absorbiert wurde.

1.3. Chemische Natur

Biliproteide bestehen aus einem Proteinanteil und dem Chromophor. Die Chromophore gehören zur Reihe der Gallenfarbstoffe und werden von den Algenzellen auf dem Porphyrinbiosyntheseweg synthetisiert (Troxler et al. 1966, 1973, 1975). Die roten und blauen Chromophore unterscheiden sich in der Zahl der konjugierten Doppelbindungen. Während der rote Farbstoff, das sogenannte Phycoerythrobilin (Abb. 1a) zwischen Ring C und D eine Einfachbindung besitzt, hat das Phycocyanobilin (Abb. 1b, Chromophor des Phycocyanins und des Allophycocyanins) hier eine weitere

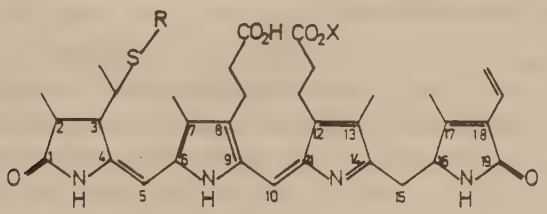

Abb. 1a: Chromophor des Phycoerythrins: Phycoerythrobilin

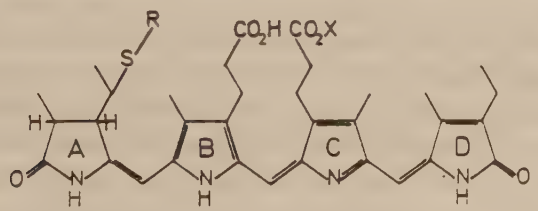

Abb. 1b: Chromophor des Phycocyanins: Phycocyanobilin
R = Protein; X = H oder Protein (siehe Text)

Doppelbindung, wodurch das π-Elektronensystem um zwei Bindungen verlängert wird.

An das Protein ist der Chromophor kovalent über eine Thioätherbindung an Ring A gebunden (Rüdiger 1968, 1 und 2, 1969 a und b; Schoch et al. 1976 a und b; Köst 1974; Frank et al. 1978; Williams et al. 1978; Freidenreich et al. 1978; Bryant et al. 1978).
Inwieweit ein Teil der Chromophore über eine weitere kovalente Bindung im Protein fixiert ist, ist noch nicht endgültig geklärt (Muckle et al. 1978; Glazer et al. 1979). Die Phycoerythrine enthalten fünf oder sechs Chromophore pro Monomer (Muckle, Rüdiger 1977), Phycocyanin drei (Glazer, Fang 1973 b) und Allophycocyanin zwei Chromophore (Glazer 1977).

Biliproteide sind aus zwei Polypeptidketten aufgebaut, der leichteren α-Untereinheit und der schwereren ß-Untereinheit (Glazer 1977). Beim B-Phycoerythrin wurde dagegen auch eine γ-Untereinheit gefunden (Glazer, Hixson 1977). Bei der Isolierung der Biliproteide findet man die Proteine als Monomere (αß) oder höhere Homologe $(\alpha ß)_n$ vor (O'Carra, O'hEocha 1976).

1.4. Aufgaben und Problemstellung

Anfang der siebziger Jahre gab es Hinweise, daß neben dem bereits erwähnten intermolekularen Energietransfer zwischen den verschiedenen Biliproteiden auch ein intramolekularer Energietransfer zwischen verschiedenen Chromophoren innerhalb eines Proteinmoleküls stattfindet (Goedheer, Birnie 1965; Teale und Dale 1970; Dale und Teale 1970: Vernotte 1971; Vernotte und Moya 1973).
Die Untersuchungen von Teale und Dale an isolierten Biliproteiden ließen vermuten, daß wenigstens zwei verschiedene Chromophortypen vorkommen, nämlich die sensitisierenden ('s')-Chromophore und die fluoreszierenden ('f')-Chromophore. Die sensitisierenden Chromophore, die kürzerwellig absorbieren, fluoreszieren selber nicht, sondern übertragen ihre Energie auf die längerwellig absorbierenden 'f'-Chromophore, die fluoreszieren, sofern kein weiteres, geeignetes Akzeptormolekül vorhanden ist.

Nach diesem Prinzip müßten chemisch identische Chromophore (Köst et al. 1975) in verschiedenen Energiezuständen im Proteinmolekül vorliegen.
Weitere Untersuchungen bestätigten dies: Glazer et al. (1973) schloß aufgrund der Absorptionsspektren der isolierten und renaturierten α- und ß-Untereinheiten des C-Phycocyanins, daß die ß-Untereinheit zwei Chromophore des 's'-Typs enthält, während die α-Untereinheit einen Chromophor des 'f'-Typs trägt. Im Laufe dieser Arbeit wurde dieses Konzept weiterhin für C-Phycocyanin (Csatorday 1978) sowie für Biliproteide aus Cryptomonaden bestätigt (MacColl, Berns 1978).
Im Rahmen dieser Arbeit sollten Chromophore des 's'- und 'f'-Typs im C-Phycoerythrin nachgewiesen und der intramolekulare Energietransfer untersucht werden. Zu diesem Zweck sollten die α- und ß-Untereinheiten isoliert und renaturiert werden. Nach Muckle und Rüdiger (1977) enthält die α-Untereinheit zwei, die ß-Untereinheit drei Chromophore.

Die Chromophore werden bei gefalteter Proteinkette außer durch kovalente Bindungen vor allem durch nicht-kovalente Bindungen in einer definierten Konformation im Protein fixiert (Scheer 1978). Bei Proteindenaturierung gehen die nicht-kovalenten Bindungen verloren. Es kommt zu Konformationsänderungen der Chromophore, wobei sich die spektralen Eigenschaften ändern (Köst 1974).
Die schrittweise Proteinentfaltung sollte mit der Fragestellung untersucht werden, ob die einzelnen Chromophore bei unterschiedlichen Denaturierungsbedingungen von der nativen Konformation in die Konformation bei denaturiertem Protein übergehen. Dies würde auf unterschiedliche Proteinumgebungen oder auf energetisch unterschiedliche Chromophorkonformationen hinweisen.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob im nativen C-Phycoerythrin eine unterschiedliche Reaktivität der Chromophore gegenüber Oxidationsmitteln besteht. Auf diese Weise sollte ein Teil der Chromophore chemisch selektiv verändert werden.

2. Isolierung, Reinigung und Charakterisierung des C-Phycoerythrins und der α- und ß-Untereinheit

2.1. Anzucht und Ernte der Algen

C-Phycoerythrin wurde aus der Blaualge Pseudanabaena W 1173 isoliert. Dieser Cyanobakterienstamm wurde 1973 in einem Wasserpflanzenbeet des Botanischen Gartens (Universität München) gefunden, isoliert und später der Gattung -Pseudanabaena- zugeordnet (Wagenmann 1977). Die Gattung Pseudanabaena gehört zur Ordnung der Nostocales. Kennzeichen dieser Cyanobakterien sind Trichome und Filamente hormogonaler Organisation, wobei die Fäden keine oder nur eine unechte Verzweigung aufweisen. Diese Spezies zeigt außerdem eine deutliche Kriechbewegung auf Agarnährböden.
Pseudanabaena W 1173 wurde auf Schrägagarröhrchen und Agarplatten kultiviert. Zur Anzucht größerer Mengen wurden die Algen zunächst auf Flüssigkulturen in 200 ml Erlenmeyerkolben überimpft. Diese Kulturen wurden zum Animpfen für 3l Zuchtröhrchen verwendet. Nach etwa zehntägigem Wachstum bei Raumtemperatur wurden die Algen geerntet oder zur Anzucht größerer Mengen auf 60l PVC-Tonnen übertragen. Bei dieser stufenweisen Vermehrung wurde besonders auf ein kräftiges Wachstum der Algenkulturen geachtet. Überalterte Zellkulturen zeigten bei der mikroskopischen Betrachtung einen größeren Anteil kurzkettiger Fäden und lysierter Zellen. Dieses Algenmaterial wurde verworfen.
Die Algenkulturen wurden in Kühlzentrifugen abzentrifugiert, mit Phosphatpuffer gewaschen und anschließend bei -15°C aufbewahrt.

2.2. Isolierung und Reinigung des C-Phycoerythrins

Bei der Isolierung und Reinigung von Biliproteiden ist eine Zerstörung des Proteins durch proteolytische Enzyme zu vermeiden. Einige Autoren (O'hEocha, Haxo 1960; Nultsch 1962; Fujimori, Pecci 1966; Pecci, Fujimori 1968; O'Carra 1965) beschreiben das Auftreten eines spektral veränderten Phycoerythrins nach Aufarbeitung gealterter Algenzellen. Wie die Untersuchungen von Muckle (1978) und Wagenmann (1977) zeigen, entsteht bei langen Aufarbei-

tungszeiten und ungenügender Kühlung ebenfalls ein abgebautes Phycoerythrin, das sogenannte Phycoerythrin II (PE II). Dieses Phycoerythrin II zeigt zwei Maxima im Absorptionsspektrum (zwischen 500 und 600 nm), deren Intensitätsverhältnisse zueinander variieren. Elektrophoretisch ist dieses Protein uneinheitlich, es zeigen sich mehrere Banden von geringerem Molekulargewicht als natives Phycoerythrin.
Um bei der Aufarbeitung eine Proteolyse zu vermeiden, wurde durchgehend bei 4°C gearbeitet. Zur schnellen Abtrennung von Fremdproteinen wurde der gesamte Rohextrakt sofort einer 30 % Ammoniumsulfatfällung und einer Vorreinigung durch Gelchromatographie (Sephadex G-100) unterworfen. Auf diese Weise konnte die Bildung eines proteolytisch abgebauten Phycoerythrins vermieden werden. Eine vollständige Reinigung des Phycoerythrins wurde durch anschließende Ionenaustauschchromatographie (Anionenaustauscher DEAE-Cellulose) erreicht. Die Phycoerythrin-haltigen Fraktionen wurden durch Ammoniumsulfatfällung konzentriert und gegen zweifach destilliertes Wasser dialysiert. Dabei mußten lange Dialysezeiten vermieden werden, da diese zum Ausbleichen und Ausfallen der Proteinlösungen führten. Das dialysierte Material wurde lyophilisiert und bei 4°C aufbewahrt.

2.3. Reinheitskriterien

2.3.1. Disk-Gelelektrophorese

Die Reinheit des isolierten Phycoerythrins wurde mit Hilfe der Disk-Gelelektrophorese überprüft. Abbildung 2 zeigt eine einheitliche Phycoerythrinzone. Auch nach Anfärben mit Coomassie Brilliant Blau waren keine Fremdproteine oder niedermolekularen Abbauprodukte zu erkennen. Die im Rohextrakt vorhandenen Phycoerythrinaggregate höheren Molekulargewichts (Zone 1 und 2, Abb. 2a) sind vermutlich während der Aufarbeitung dissoziiert. In Spuren waren sie in manchen Fällen auch nach der Aufarbeitung noch zu erkennen. Entsprechende Ergebnisse erzielten Muckle (1978) und Wagenmann (1977). Im Gegensatz dazu berichten Glazer und Cohen-Bazire (1971) sowie Gray und Gantt (1975) von zwei

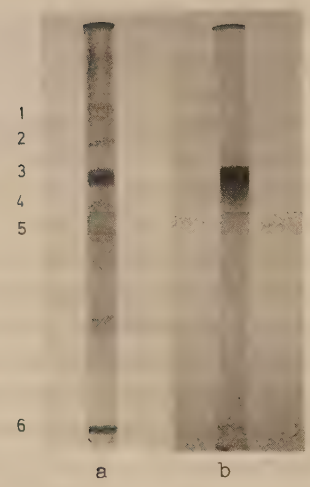

Abb. 2: Disk-Gelelektrophorese vom Rohextrakt (a) aus Pseudanabaena W 1173 und von gereinigtem C-Phycoerythrin (b) in 7,7 % Acrylamidgelen bei pH 8,8. Laufzeit: 4-5 Stunden.

bzw. drei Phycoerythrin-Banden bei der Gelelektrophorese von gereinigtem Material. Hier wurde das C-Phycoerythrin aus anderen Algenspecies und unter anderen Aufarbeitungsbedingungen isoliert. Wie von Wagenmann (1977) gezeigt wurde, hängt die Aggregation von C-Phycoerythrinen von der Algenspecies ab, aus der dieses Biliproteid isoliert wurde. Ein zusätzlicher Effekt wird durch die Art der Aufarbeitung hervorgerufen. Die Isolierung bei einem pH-Wert in der Nähe des isoelektrischen Punktes scheint die Ausbildung höherer Aggregate zu bevorzugen (Glazer, Cohen-Bazire 1971; Bennett, Bogorad 1971). Ein entsprechendes Verhalten wurde auch bei C-Phycocyanin beobachtet (Chapman 1973).

2.3.2. SDS-Gelelektrophorese

Wie bereits erwähnt, kann bei der Isolierung und Reinigung von Biliproteiden ein proteolytischer Abbau stattfinden. Untersuchungen von Wagenmann (1977) zeigten, daß beim C-Phycoerythrin aus

Pseudanabaena W 1173 die α-Untereinheit besonders leicht abgebaut wird. Die Homogenität und Reinheit des Produkts wurde deshalb zusätzlich geprüft durch die densitometrische Auswertung der α- und ß-Zone, in welche das Phycoerythrin bei der Elektrophorese in Anwesenheit von Natriumdodecylsulfat (SDS) aufspaltet (Abb. 4, S. 14). Die Methode ist bei Wagenmann (1977) beschrieben. Monomeres C-Phycoerythrin (αß) besteht aus einer α- und einer ß-Untereinheit. Da sich die Molekulargewichte der Untereinheiten nur um etwa 2500 Dalton unterscheiden (Wagenmann 1977), sollte die densitometrische Auswertung ein 1:1 Verhältnis für den relativen Proteingehalt ergeben. Zur Bestimmung des Proteingehaltes wurden die Gelröhrchen mit Coomassie-Blau angefärbt. Zur Bestimmung des relativen Chromophorgehaltes wurden die Gelröhrchen in 6 M Harnstofflösung pH 3 inkubiert. Bei diesem pH-Wert liegen die Chromophore als Kationen vor. Die densitometrische Auswertung ist unter diesen Bedingungen genauer, da die Extinktion höher ist und die Chromophore nicht so schnell ausbleichen. Da auf der α-Untereinheit zwei und auf der ß-Untereinheit drei Chromophore lokalisiert sind (Muckle, Rüdiger 1977), sollte der relative Chromophorgehalt ein 2:3 Verhältnis aufweisen. In Abbildung 3 ist ein Beispiel eines solchen Densitogramms

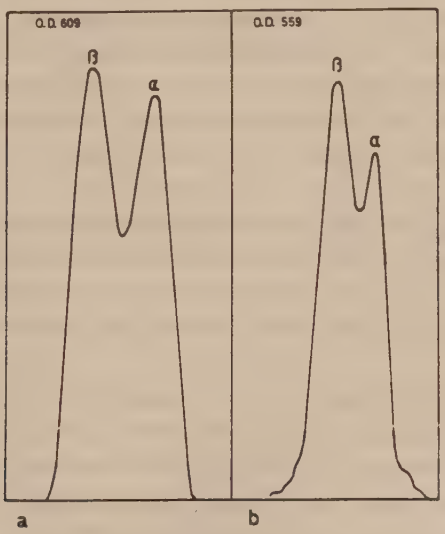

Abb. 3: Densitogramme der durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Untereinheiten des C-Phycoerythrins aus Pseudanabaena W 1173 a) nach Anfärben mit Coomassie-Blau b) nach Inkubation in 6 M Harnstoff pH 3.0.

dargestellt. Durch Integration der Kurven werden die relativen Verhältnisse bestimmt. Die Genauigkeit der Messung hängt dabei von der Trennschärfe und der Dicke der Banden ab und lag bei unseren Untersuchungen zwischen 2 und 10 % (Standardabweichungen bei 3-6 Meßwerten pro Gel).
Muckle und Rüdiger (1977) fanden einen relativen Proteingehalt von 1,02:1 und einen relativen Chromophorgehalt von 1:1,4 für α:ß-Untereinheit. Für unsere weiteren Untersuchungen wurde nur C-Phycoerythrin verwendet, das diesen Bedingungen entsprach. Der Mittelwert des relativen Chromophorgehaltes lag bei unseren Untersuchungen etwas höher, bei 1:1,49 $\pm$ 6,2 % (Mittelwert mit Standardabweichung aus acht Aufarbeitungen).

2.3.3. Absorptionsspektren, Reinheitsgrad und Extinktionskoeffizient

Das Elektronenspektrum (Abb. 5, S. 15) des nativen C-Phycoerythrins weist charakteristische Merkmale auf: bei 280 nm die Absorptionsbande der aromatischen Aminosäuren des Proteinanteils, zwei weitere Banden im UV-Bereich (315 nm, $\sim$ 380 nm) sowie die sichtbare Bande bei $\sim$ 560 nm. Für ein gereinigtes C-Phycoerythrin sollte das Verhältnis zwischen Absorptionsmaximum ($E_{560\ nm}$) und Proteinpeak konstant sein. Verunreinigungen durch Fremdprotein oder Ausbleichen der Chromophore erniedrigen dieses Verhältnis. Dieser Quotient kann als Reinheitskriterium zur Beurteilung von Biliproteiden herangezogen werden (= Reinheitsgrad).

In Tabelle 1 sind einige Reinheitsgrade sowie spezifische Extinktionskoeffizienten für C-Phycoerythrin aus verschiedenen Blaualgen zusammengestellt. Die für C-Phycoerythrin aus Pseudanabaena gefundenen Reinheitsgrade entsprechen den Literaturwerten.

Dagegen liegen die spezifischen Extinktionskoeffizienten etwas niedriger. Diese Abweichung kann mit der unterschiedlichen Chromophorzahl zusammenhängen. Während für C-Phycoerythrin aus Pseudanabaena W 1173 und aus Tolypothrix tenuis fünf Chromophore pro Monomer ermittelt wurden, enthalten alle anderen in Tabelle 1 angegebenen C-Phycoerythrine 6 Chromophore (Muckle, Rüdiger 1977).

Tabelle 1: Reinheitsgrade und spezifische Extinktionskoeffizienten von C-Phycoerythrin aus verschiedenen Blaualgen

Organismus	λ_{max}	$E^{1\,\%}_{1\,cm}$	E_{max}/E_{280}	Literatur
Nostoc sp.	551 nm		6,5	Gray, Gantt 1975
Schizothrix cal.	560 nm		5,9	Teale, Dale 1970
Aphanocapsa sp.	562 nm	127		Glazer, Hixson 1975
Phormidium pers.	562 nm	125[a,b]	7,5[b]	a) O'Carra 1965
Tolypothrix ten.	565 nm	126	7,9	Hattori, Fujita 1959
Fremyella dipl.	562 nm	96,2[d] 126[b]	7,5[c]	c) Bennett, Bogorad 1971 d) Bennett, Bogorad 1973
Pseudanabaena W 1173	556 nm	98	6,8-7,0	b) Muckle 1978
Pseudanabaena W 1173	558 nm	102	7,8	diese Arbeit

Außerdem kann diese Abweichung auch auf einem unterschiedlichen Aggregationszustand der gemessenen C-Phycoerythrinlösungen beruhen. Dafür sprechen die etwas langwelligeren Absorptionsmaxima dieser Lösungen (Tabelle 1). Bennett und Bogorad (1971) sowie Gray und Gantt (1975) konnten mit Hilfe der Differenzspektroskopie zeigen, daß hexameres Phycoerythrin etwas langwelliger absorbiert als das monomere Produkt. Für C-Phycocyanin wurde ein Anstieg im Extinktionskoeffizienten für die hexamere Form gegenüber der monomeren gefunden (Glazer et al. 1973). Der in Tabelle 1 angegebene Wert für Phycoerythrin aus Pseudanabaena W 1173 entspricht dem monomeren Produkt, da die Konzentration der gemessenenen Lösungen niedrig war (0,1 mg/ml) und in diesem Konzentrationsbereich monomeres Phycoerythrin vorliegt (siehe dazu Abschnitt Molekulargewichtsbestimmungen).
Die in Tabelle 1 angegebenen Werte für C-Phycoerythrin aus Pseudanabaena W 1173 sind Höchstwerte. Durchschnittlich lag der Reinheitsgrad zwischen 6,5 und 7,2 und der spezifische Extinktionskoeffizient zwischen 93 und 100.

2.4. Präparative Isolierung der Untereinheiten

Die Untereinheiten wurden durch Ionenaustauschchromatographie auf dem schwach sauren Ionenaustauscher Bio-Rex 70 (Acryl-Matrix) mit einem linearen Harnstoffgradienten von 5-8 M bei pH 2,9 isoliert. Diese Methode geht zurück auf Glazer und Fang (1973 a) und wurde zuerst von Takemoto und Bogorad (1975) für die Isolierung von C-Phycoerythrin-Untereinheiten aus Fremyella diplosiphon angewendet. Mit einer modifizierten Methode gelang es Muckle (1978), Untereinheiten aus C-Phycoerythrin aus Pseudanabaena W 1173 zu isolieren. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine bessere Reproduzierbarkeit erzielt werden durch vollständige Denaturierung des Phycoerythrins in 8 M Harnstoff und vorsichtige Rückdialyse auf 5 M Harnstoff (entspr. den Startbedingungen) vor Auftragen der Probe auf den Ionenaustauscher. Eine Erhöhung des Harnstoffgradienten auf 5-8 M führte zu höheren Ausbeuten. Der von Muckle (1978) angegebene Gradient von 5-7 M Harnstoff reichte oft nicht zur vollständigen Elution des gesamten Materials aus.

Die Renaturierung der Untereinheiten (Entfernen des Harnstoffs) gelang durch Gelfiltration mit Biogel-P_2 (Polyacrylamid-Gel). Bei dem von Takemoto und Bogorad sowie von Muckle vorgeschlagenen Dialyseverfahren fiel ein großer Teil des isolierten Materials durch irreversible Denaturierung aus. Eine unvollständige Renaturierung des verbleibenden Produkts konnte an den uncharakteristischen Absorptionsbanden im UV-Bereich des Elektronenspektrums erkannt werden. Die Gelfiltration bietet dagegen einige Vorteile: erstens verläuft die Renaturierung wesentlich schneller (15-30 Minuten). Dadurch scheint eine Denaturierung weitgehend verhindert zu werden. Zweitens können geringe Anteile unvollständig renaturierter Untereinheiten leicht abgetrennt werden, da sie auf der Säule langsamer laufen und eine bläulichere Farbe aufweisen. Drittens konnte ein Ausbleichen auf ein Minimum reduziert werden.
Die Renaturierung läßt sich optisch sehr gut durch das Auftauchen der Fluoreszenz verfolgen.

2.5. Identifizierung und Charakterisierung der renaturierten Untereinheiten

2.5.1. SDS-Gelelektrophorese

Die Untereinheiten wurden mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese identifiziert (Abb. 4). Durch Vergleich der Laufstrecken der isolierten Untereinheiten mit denen des nativen C-Phycoerythrins kann eine eindeutige Zuordnung getroffen werden. Gleichzeitig können Verunreinigungen durch unvollständige Trennung erkannt werden. Proteinbanden mit kürzeren Laufstrecken, die auf höhermolekulare Aggregate hinweisen würden, wurden nicht beobachtet. Entsprechende Ergebnisse erzielten Glazer und Fang (1973 b) sowie Troxler et al. (1975) bei der Isolierung von Phycocyanin-Untereinheiten und Bryant et al. (1976) bei der Isolierung von Phycoerythrocyanin-Untereinheiten. Im Gegensatz dazu beobachteten Takemoto und Bogorad (1975) auf der SDS-Gelelektrophorese von isolierten C-Phycoerythrin-Untereinheiten Banden, die auf Molekulargewichte von 40 000 und 80 000 Dalton hinwiesen. Hochmolare Aggregate fanden auch Glazer und Hixson (1977) bei B- und b-Phycoerythrin-Untereinheiten.

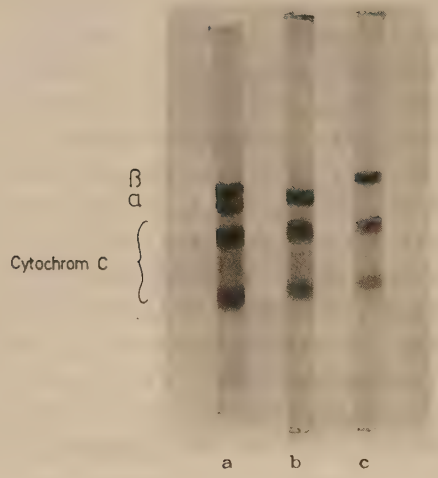

Abb. 4: Mit Coomassie-Blau angefärbte SDS-Gele des C-Phycoerythrins (a) und der renaturierten α- (b) und ß- (c)-Untereinheit.

2.5.2. Absorptionsspektren

In Abbildung 5 a und b sind die Absorptionsspektren des C-Phycoerythrins und der Untereinheiten bei gleicher molarer Proteinkonzentration dargestellt. Bei entfaltetem Proteinanteil (Abb. 5 b) sind die Spektren identisch und additiv. Die Extinktionen der Absorptionsmaxima bei 555 nm bestätigen somit das Chromophorverhältnis 5:3:2 für PE:ß:α (Muckle, Rüdiger 1977). Aus der Tatsache, daß alle drei Spektren bei denaturiertem Protein identisch sind, folgt, daß alle fünf Chromophore chemisch identisch sind (Köst et al. 1975). Im Gegensatz dazu unterscheiden sich die Absorptionsspektren bei gefaltetem Proteinanteil (Abb. 5 a). Während bei der α-Untereinheit eine Aufspaltung in zwei Maxima (bei 545 nm und 566 nm) auftritt, zeigt sich bei der ß-Untereinheit eine Schulter bei 535 nm. Wie aus der Abbildung ersichtlich, bewirkt Proteinfaltung eine Zunahme der Oszillatorstärke. Ver-

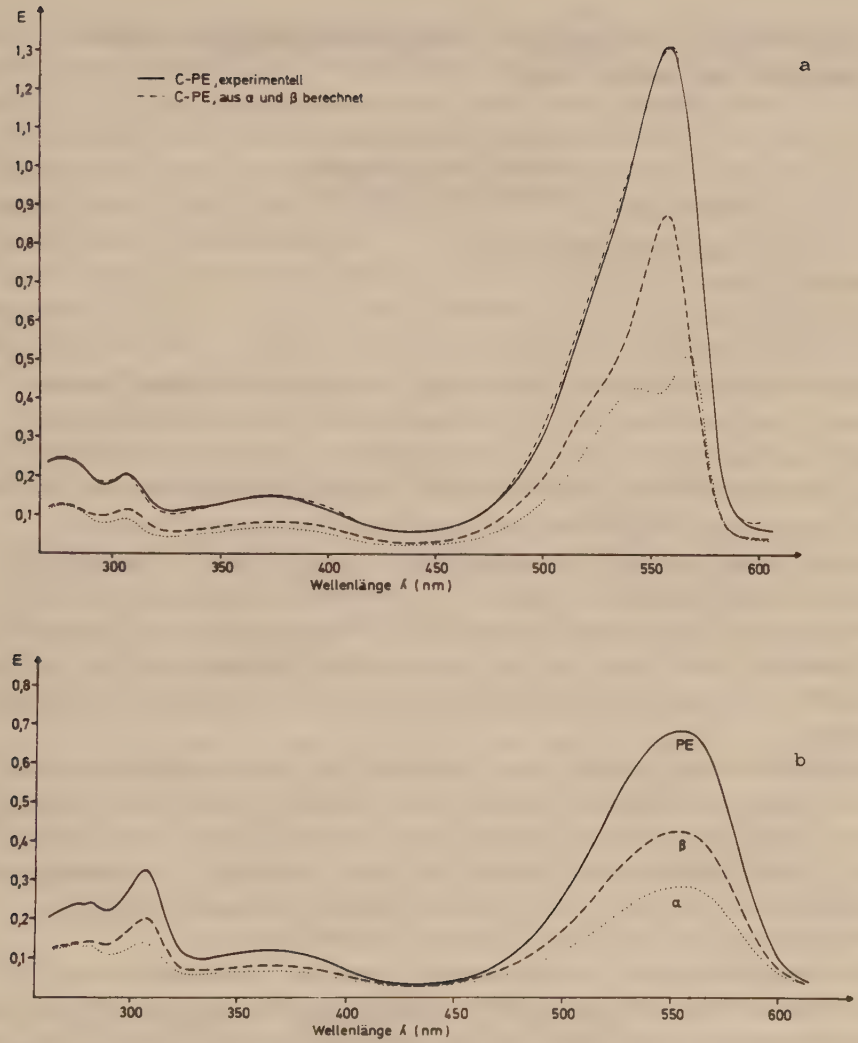

Abb. 5: Absorptionsspektren des C-Phycoerythrins (——) und der α-Untereinheit (.....) und ß-Untereinheit (-----) aus Pseudanabaena W 1173.
Die Proteinkonzentration beträgt 3,3 x 10^{-6} Mol/l.
a) In destilliertem Wasser.
b) In 8 M Harnstoff bei pH 3,0 (eingestellt mit Eisessig).
In Abb. 5 a ist das durch Addition der Absorptionsspektren der α- und ß-Untereinheit berechnete Spektrum (-.-.-.) des C-Phycoerythrins dargestellt.

gleicht man die Flächen der Absorptionsbanden miteinander (zwischen 460 und 620 nm):

$$f = \frac{\text{nativ (pH 7,0)}}{\text{denaturiert (pH 3,0)}}$$

so findet man folgende Werte:
PE f = 1,45
α f = 1,45
ß f = 1,43.
Die Intensitätszunahme, die durch die Proteinfaltung bewirkt wird, ist in allen drei Proteinen gleich groß. Daraus folgt, daß die Assoziation der α-Untereinheit mit der ß-Untereinheit zu monomerem C-Phycoerythrin (αß) keinen zusätzlichen Einfluß auf die Oszillatorstärke der einzelnen Chromophore ausübt. Addiert man die Absorptionsspektren der α- und ß-Untereinheit (gestrichelte Linie in Abb. 5 a), so erhält man qualitativ und quantitativ das Absorptionsspektrum des monomeren C-Phycoerythrins. Umgekehrt heißt das, daß man das Absorptionsspektrum des C-Phycoerythrins in die Absorptionsspektren der Untereinheiten zerlegen kann.
Proteinfaltung bewirkt eine Änderung der Chromophoreigenschaften. Die Oszillatorstärke nimmt zu, die Absorptionsspektren verändern sich, die Chromophore fluoreszieren stark. Diese Änderungen sind mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine veränderte Chromophorkonformation sowie auf eine eingeschränktere Beweglichkeit der Chromophore im gefalteten Protein zurückzuführen.
Vergleicht man die α-Untereinheit mit der ß-Untereinheit, so wird deutlich, daß nicht alle Chromophore in gleicher Weise verändert werden. Die Form der Absorptionsspektren sowie die Lage der Maxima unterscheiden sich. Die Aufspaltung in ein kurzwelligeres (545 nm) und in ein langwelligeres (566 nm) Maximum bei der α-Untereinheit deutet darauf hin, daß der eine Chromophor bei höherer Energie absorbiert als der andere.
Im Prinzip könnte dieses zweite Maximum (545 nm) auch ein ausgeprägter Schwingungsübergang oder ein weiterer Elektronenübergang von beiden Chromophoren der α-Untereinheit sein. Einen Schwingungsübergang können wir jedoch aufgrund der Polarisationsgradspektroskopie ausschließen (siehe dazu Abschnitt 3.4.1.).

Einen weiteren Elektronenübergang in diesem Absorptionsbereich können wir aufgrund der MO-Berechnungen von Falk und Mitarbeitern (1977 b) an einem verwandten Biliviolin ausschließen.
Die unterschiedlichen Chromophorkonformationen der einzelnen Chromophore werden durch die Proteinfaltung der α- und der ß-Kette festgelegt. Die Assoziation zu monomerem Phycoerythrin bewirkt keine Änderung mehr.
Zu ähnlichen Ergebnissen führten die Untersuchungen von Glazer und Fang (1973 b) an Phycocyanin-Untereinheiten. Die additive Überlagerung der α- und ß-Absorptionsspektren ergibt auch hier ein mit monomerem Phycocyanin (αß) nahezu identisches Absorptionsspektrum.

2.5.3. Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten

Die molaren Extinktionskoeffizienten der α- und ß-Untereinheit wurden gravimetrisch bestimmt. Zur Berechnung wurden die von Wagenmann (1977) über SDS-Gelelektrophorese ermittelten Molekulargewichte herangezogen. In Tabelle 2 sind die Ergebnisse sowie einige Literaturdaten zusammengestellt.
Im Falle des C-Phycoerythrins und des C-Phycocyanins aus Anacystis nidulans stimmt die Summe der Extinktionskoeffizienten mit dem des monomeren Biliproteids recht gut überein.
Von Takemoto und Bogorad (1975) wurden molare Extinktionskoeffizienten für denaturierte Untereinheiten (8 M Harnstoff, pH 2,2) aus C-Phycoerythrin (Fremyella diplosiphon) angegeben. Die ermittelten Werte sind jedoch zu niedrig (Muckle, Rüdiger 1978).

2.5.4. Bestimmung der isoelektrischen Punkte

Die Untersuchungen von Wagenmann zeigten, daß ein großer Teil der Biliproteide in zwei oder mehr Zonen während der isoelektrischen Fokussierung aufspalten. Die Aufspaltung des C-Phycoerythrins in zwei Banden beruht jedoch nicht auf einer Dissoziation in die α- und ß-Untereinheit, wie aus Tabelle 3 hervorgeht. Die isoelektrischen Punkte der Untereinheiten sind etwas basischer als die des nativen Biliproteids. Das deutet darauf hin,

Tabelle 2: Absorptionsmaxima und molare Extinktionskoeffizienten einiger Biliproteide und ihrer Untereinheiten

Organismus	Protein	λ_{max}	ε_M (M^{-1} cm^{-1})	Literatur
Anacystis nid.	C-Phycocyanin	615 nm[b]	230 000[b]	Glazer, Fang
	α-Untereinheit	620 nm	98 000	1973 b
	ß-Untereinheit	608 nm	143 000	
Cyanidium cal.	C-Phycocyanin	625 nm	263 000	Troxler et al.
	α-Untereinheit	618 nm	46 000	1975
	ß-Untereinheit	600 nm	128 000	
Anabaena var.	Allophycocyanin	649 nm	163 000	Bryant et al.
	α-Untereinheit	614 nm	96 400	1976
	ß-Untereinheit	610 nm	85 600	
Synechococcus	Allophycocyanin	648 nm	209 000	Cohen-Bazire[a]
6301	α-Untereinheit	615 nm	97 200	1977
	ß-Untereinheit	610 nm	89 300	
Pseudanabaena	C-Phycoerythrin	560 nm	422 000	Muckle 1978
W 1173		558 nm	433 000	diese Arbeit
	α-Untereinheit	566 nm	151 000	diese Arbeit
	ß-Untereinheit	557 nm	266 000	diese Arbeit

a) aus dieser Arbeit wurde nur ein Vergleichswert herangezogen
b) diese Werte entsprechen monomerem Phycocyanin

daß an der Kontaktstelle zwischen α- und ß-Untereinheit bevorzugt basische Gruppen liegen, so daß im Phycoerythrin im Verhältnis mehr saure Aminosäuren an der Oberfläche liegen.
Ein ähnliches Verhalten ist auch bei anderen Biliproteiden zu beobachten (Tab. 3).
Mischt man die Untereinheiten vor der Fokussierung, so tauchen in erster Linie die beiden Banden des C-Phycoerythrins wieder auf. In geringen Mengen bilden sich auch Banden mit etwas basischeren isoelektrischen Punkten (z.B. p. I.5.12; 4,90).
Die Bestimmung der isoelektrischen Punkte kann deshalb zur Beurteilung der Renaturierung des C-Phycoerythrins herangezogen werden (siehe Abschnitt 4.3.4.).

Tabelle 3: Isoelektrische Punkte einiger Biliproteide und Untereinheiten aus verschiedenen Blaualgen

Organismus	Protein	pI	Literatur
Anabaena sp.	C-Phycocyanin	4,92	Bryant et al. 1976
	α-Untereinheit	5,90	
	ß-Untereinheit	4,60;4,76; 4,86	
Anacystis nid.	C-Phycocyanin	4,76	Glazer, Fang 1973b
	α-Untereinheit	5,26	
	ß-Untereinheit	5,17	
Anabaena var.	Allophycocyanin	4,95	Cohen-Bazire et al.
	α-Untereinheit	5,15	1977
	ß-Untereinheit	4,93	
Synechocystis sp.	Allophycocyanin	4,7; 5,5	Cohen-Bazire et al.
	α-Untereinheit	5,5	1977
	ß-Untereinheit	4,7	
Anabaena var.	Allophycocyanin	4,92;(5,11)	Bryant et al.
	α-Untereinheit	5,03	1976
	ß-Untereinheit	5,28	
Anabaena var.	Phycoerythro-cyanin	5,16; (5,25;5,37)	Bryant et al. 1976
	α-Untereinheit	6,07	
	ß-Untereinheit	5,30	
Pseudanabaena W 1173	C-Phycoerythrin	4,84 (4,74)	Wagenmann 1977 und
	α-Untereinheit	*5,31±0,04	diese Arbeit
	ß-Untereinheit	*5,01±0,05	diese Arbeit

Die Angaben in Klammern entsprechen Nebenzonen

* Mittelwerte aus fünf Bestimmungen

2.6. Bestimmung der absoluten Fluoreszenzquantenausbeuten

Ein charakteristisches Merkmal aller Biliproteide, die als Antennenpigmente der Photosynthese vorkommen, ist die starke Fluoreszenz. Die "Fluoreszenzfähigkeit" kann durch Messung der absoluten Fluoreszenzquantenausbeute bestimmt werden.
Wird ein Molekül durch Absorption eines Lichtquants angeregt, so kann es durch verschiedene photophysikalische und photochemische Reaktionen ("Zerfallskanäle") in den Grundzustand zurückkehren. Diese Prozesse sind im allgemeinen Reaktionen erster Ordnung und durch eine Geschwindigkeitskonstante k_i bestimmt. Die Ausbeute des Zerfallsprozesses i ist der Bruchteil aller Prozesse, der nach der Reaktion i abläuft. Er wird als Quantenausbeute ϕ_i bezeichnet, wenn der Ausgangszustand nach Absorption eines Lichtquants erreicht wurde (Dörr 1977):

$$\phi_i = \frac{k_i}{\sum k_j} \qquad (2.1.)$$

Für die Quantenausbeute der Fluoreszenz gilt nach (2.1.):

$$\phi_f = \frac{k_r}{k_r + \sum k_{nr}} \qquad (2.2.)$$

wobei k_r die Geschwindigkeitskonstante des strahlenden Prozesses ist und $\sum k_{nr}$ die Geschwindigkeitskonstanten aller nichtstrahlenden Prozesse.
Wird ein angeregtes Molekül nur durch Fluoreszenz desaktiviert, so ist die Quantenausbeute nach Gleichung (2.2.) gleich 1.
Die direkte Messung der absoluten Fluoreszenzquantenausbeute ist technisch sehr aufwendig. Durch Vergleich mit einem geeigneten Standard läßt sich die Bestimmung jedoch vereinfachen. Für C-Phycoerythrin ist Rhodamin B als Standard besonders geeignet, da die Fluoreszenzemissionsspektren beider Substanzen sich fast vollständig decken (Weber, Bass 1969). Eine Korrektur der Emissionsspektren, die die spektrale Empfindlichkeit des Empfängersystems berücksichtigt, ist daher nicht notwendig.

In Tabelle 4 sind die Quantenausbeuten einiger Biliproteide zusammengestellt. Insgesamt sind die Quantenausbeuten sehr hoch. Bei B-Phycoerythrin wird fast der theoretische Wert von 1 erreicht.

Quantenausbeuten renaturierter Untereinheiten sind in der Literatur bisher nicht angegeben. Lediglich relative Fluoreszenzquantenausbeuten (normiert auf gleiche Extinktion) sind für Allophycocyanin-Untereinheiten (Cohen-Bazire et al. 1977) bestimmt worden.
Während die Untereinheiten des C-Phycoerythrins etwas geringere Werte aufweisen als monomeres C-Phycoerythrin, liegt der Wert der ß-Untereinheit des Allophycocyanins etwa genauso hoch wie natives Allophycocyanin. Die α-Untereinheit liegt dagegen etwa doppelt so hoch. Ein direkter Vergleich der Allophycocyanin-Untereinheiten mit den C-Phycoerythrin-Untereinheiten ist nicht möglich, da die ersteren bei Proteinkonzentrationen zwischen 0,2 und 0,6 mg/ml als Dimere in Lösung vorliegen. Man muß hier annehmen, daß wahrscheinlich ein Gemisch aus Monomeren und Dimeren gemessen wurde. Die α- und ß-Untereinheiten des C-Phycoerythrins liegen dagegen als Monomere vor (vgl. Abschnitt 2.7.).

Bis jetzt ist noch nicht geklärt, inwieweit methodische oder physikalische Ursachen Unterschiede in den Fluoreszenzquantenausbeuten zwischen Untereinheiten und nativem Biliproteid hervorrufen. Da die Fluoreszenz im Gegensatz zur Absorption empfindlicher auf Änderungen in der Umgebung (z.B. Temperatur, Lösungsmittel) reagiert, wäre hier durchaus ein Proteineinfluß denkbar.

Es ist jedoch möglich, daß die renaturierten Untereinheiten durch denaturierte oder unvollständig renaturierte Produkte verunreinigt sind. Wie in Abschnitt 4 noch ausführlicher gezeigt wird, nimmt die Fluoreszenz schon bei beginnender Proteinentfaltung stark ab, während die Absorption nahezu unbeeinflußt bleibt. Verunreinigungen mit denaturierten bzw. unvollständig renaturierten Produkten würden somit die Quantenausbeuten erniedrigen.
Die Quantenausbeute von renaturiertem C-Phycoerythrin (Tab. 4) liegt ebenfalls im Bereich der renaturierten Untereinheiten. Bei Nachmessungen von gealtertem C-Phycoerythrin wurde ein Absinken der Quantenausbeute beobachtet.

Tabelle 4: Absolute Quantenausbeuten der Fluoreszenz bei einigen Phycoerythrinen.

Organismus	Protein	Quanten-ausbeute	Literatur
Porphyr.cruen.	B-PE	0,98 ± 0,05	Grabowski, Gantt 1978 a
Porphyr.cruen.	b-PE	0,48 ± 0,03	Grabowski, Gantt 1978 a
Porphyr.cruen.	B-PE	0,89 ± 0,08	Dale, Teale 1970
Rhodymenia pal.	R-PE	0,82	Barber, Richards 1977
Rhodymenia	R-PE	0,84 ± 0,08	Dale, Teale 1970
Fremyella dip.	C-PE	0,88 ± 0,05	Grabowski, Gantt 1978 a
Nostoc sp.	C-PE I	0,67 ± 0,04	Grabowski, Gantt 1978 a
Nostoc sp.	C-PE II	0,45 ± 0,03	Grabowski, Gantt 1978 a
Schizothrix cal.	C-PE	0,635± 0,06	Dale, Teale 1970
Pseudanabaena	C-PE	0,75 ± 0,07	diese Arbeit
W 1173	C-PE (ren.)	0,49 ± 0,11	diese Arbeit
	C-PE α-Unt.	0,51 ± 0,05	diese Arbeit
	C-PE ß-Unt.	0,56 ± 0,05	diese Arbeit
Synechococcus 6312	APC	[1] 53 ± 2	Cohen-Bazire et al. 1977
	APC α-Unt.	[1] 109 ± 4	Cohen-Bazire et al. 1977
	APC ß-Unt.	[1] 51 ± 2	Cohen-Bazire et al. 1977

[1] Die Angaben in dieser Spalte entsprechen relativen Fluoreszenzquantenausbeuten

2.7. Bestimmung der nativen Molekulargewichte

Biliproteide kommen in verschiedenen Aggregationszuständen vor. Für C-Phycoerythrin wurden Molekulargewichte zwischen ∼ 220000 (Hattori, Fujita 1959; Bennett, Bogorad 1971) und ∼ 45 000 Dalton (O'Carra, O'hEocha 1976; Muckle 1978) gefunden. Legt man für die monomere Einheit (αß) ein Molekulargewicht von ∼ 42 000 Dalton (Rüdiger 1975) zugrunde, so entsprechen die hohen Molekulargewichte wohl dem Hexameren, obwohl die Werte etwas zu niedrig liegen. Wie bereits erwähnt, hängt die Aggregation von verschiedenen Faktoren wie pH-Wert, Ionenstärke, Temperatur und Konzentration ab sowie von der Algenspecies, aus der das Biliproteid isoliert wurde. Für das C-Phycocyanin liegen eine Reihe von Untersuchungen über das Aggregationsverhalten vor (siehe dazu z.B. die Übersichtsartikel von Chapman 1973; Glazer 1976).
Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Molekulargewichte des C-Phycoerythrins und der renaturierten Untereinheiten nur insoweit untersucht werden, wie es zum Verständnis der im folgenden Kapitel beschriebenen Spektraluntersuchungen notwendig war.
Da alle Spektralmessungen mit gereinigtem, lyophilisiertem Material bei pH 7,0 und in geringen Konzentrationen vorgenommen wurden, wurden die Untersuchungen,soweit es technisch möglich war, bei entsprechenden Bedingungen durchgeführt.

2.7.1. Gelchromatographie

Die Molekulargewichte wurden durch Gelfiltration an Sephacryl S-200 (Fraktionierungsbereich 5000-250 000 Dalton, Pharmacia) bestimmt. Eine Eichgerade wurde mit verschiedenen Eichproteinen bekannten Molekulargewichts ermittelt. Die Konzentrationsabhängigkeit der Molekulargewichte wurde ermittelt, indem verschiedene Anfangskonzentrationen aufgetragen wurden. In Tabelle 5 sind die Ergebnisse zusammengestellt.

Tabelle 5: Molekulargewichtsbestimmungen durch Gelchromatographie

Protein	Konzentration	Molekulargewicht Dalton
C-PE	0,1 mg/0,5 ml	40 500
C-PE	0,25 mg/1,0 ml	42 500
C-PE	0,5 mg/1,0 ml	48 300 (41 000)
C-PE	1,0 mg/1,0 ml	54 000 (44 000, 72 000)
C-PE	1,0 mg/0,5 ml	66 000; 150 000 NP (44 000; 81 000)
C-PE	2,0 mg/1,0 ml	86 000; 180 000 NP (72 000)
α-Untereinheit	0,4 mg/1,0 ml	20 500
ß-Untereinheit	0,4 mg/1,0 ml	22 400

In Klammern gesetzte Werte entsprechen Schultern im Elutionsdiagramm. NP = Nebenpeak

Eindeutige Molekulargewichte entsprechend symmetrischen Peaks im Elutionsdiagramm wurden nur für niedrige Konzentrationen erhalten. Bei allen höheren Konzentrationen deuteten unsymmetrische Peaks sowie Schultern im Elutionsdiagramm an, daß hier verschiedene Formen in der Lösung vorlagen, die zum Teil als Nebenpeak, wenn auch in sehr geringer Menge, separiert werden konnten. Obwohl hier eine Aggregation zu höheren Homologen bei steigender Proteinkonzentration deutlich sichtbar wird, liegt auch bei einer recht hohen Anfangskonzentration von 2,0 mg/ml noch im wesentlichen das Dimere vor. Unter den hier angewendeten Bedingungen scheint die Aggregationstendenz zwar vorhanden, jedoch nicht sehr ausgeprägt zu sein.

Im Gegensatz dazu fanden Bennett und Bogorad (1971) für C-Phycoerythrin aus Fremyella diplosiphon als Hauptkomponente eine Spezies von 180 000 - 210 000 Dalton (Gelchromatographie Sephadex G-200). In dieser Arbeit wurde die Ausgangskonzentration nicht angegeben. Auch von Hattori und Fujita (1959) wurde hochmolares C-Phycoerythrin (226 000 Dalton) gefunden. Leider fehlen auch in dieser Arbeit genaue Angaben über die untersuchten Konzentrationsbereiche, so daß ein direkter Vergleich nicht möglich ist.

Für die Untereinheiten wurden Molekulargewichte gefunden, die den monomeren Produkten entsprechen. Die ermittelten Werte stimmen gut mit den über SDS-Gelelektrophorese bestimmten Daten überein (α-Untereinheit 19 400, ß-Untereinheit 22 800; Wagenmann 1977). Die Aggregation renaturierter Untereinheiten wurde von Glazer und Mitarbeitern (1973) für C-Phycocyanin-Untereinheiten und von Cohen-Bazire et al. (1977) für Allophycocyanin-Untereinheiten untersucht. Für beide Allophycocyanin-Untereinheiten sowie für die ß-Untereinheit des C-Phycocyanins wurden Dimere gefunden. Die α-Untereinheit des C-Phycocyanins scheint weniger stark zu aggregieren, da ein Molekulargewicht von 26 700 gefunden wurde, welches näher beim Monomeren (18 500 SDS-Gelelektrophorese; Glazer 1976) liegt.

2.7.2. Sedimentationsgleichgewichtsanalyse

Für zwei Konzentrationen wurden die Molekulargewichte des C-Phycoerythrins durch Sedimentationsgleichgewichtsanalyse nach der Methode von Yphantis (1964) bestimmt (Tab. 6). Es wurden auch Konzentrationen zwischen 0,6-1,0 mg/ml bei verschiedenen Umdrehungsgeschwindigkeiten und Zeiten untersucht. Diese Läufe deuteten jedoch auf Heterogenität, da keine auswertbaren Geraden ermittelt werden konnten.

Tabelle 6: Molekulargewichtsbestimmungen durch Sedimentationsgleichgewichtsanalyse

Protein	Konzentration	Molekulargewicht
C-PE	0,3 mg/ml	41 200
C-PE	1,5 mg/ml	93 200

Die Ergebnisse entsprechen im wesentlichen den Molekulargewichtsbestimmungen durch Gelchromatographie.

2.7.3. Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten

Zusätzlich zu den Molekulargewichten wurden die Sedimentationskoeffizienten für einige Proteinkonzentrationen des C-Phycoerythrins sowie für die Untereinheiten ermittelt.

Aus dem Sedimentationskoeffizienten kann ohne zusätzliche Annahmen das Molekulargewicht noch nicht berechnet werden, da der Sedimentationskoeffizient außer vom Molekulargewicht noch vom Reibungskoeffizienten f_s abhängt (Elias 1961):

$$s = \frac{M\,(1-V^*\,\rho_1)}{f_s\;N_L} \qquad (2.3.)$$

N_L = Lohschmidtsche Zahl
V^* = partielles spezifisches Volumen des Gelösten
ρ_1 = Dichte des Lösungsmittels
η = Viskosität des Lösungsmittels (Formel 2.5.)

Unter Einführung des Stoke'schen Gesetzes kann der Reibungskoeffizient

$$f_s = 6\pi\eta r \qquad (2.4.)$$

berechnet werden.
Durch Einsetzen von Gleichung 2.4. in Gleichung 2.3. wurde Formel 2.5. zur Berechnung des Molekulargewichtes hergeleitet (Elias 1961):

$$M = \frac{N_L\,\pi}{V^*} \times 9 \times \sqrt{2} \times \left(\frac{\eta\, s_o\; V^*}{(1 - V^*\,\rho_1)}\right)^{3/2} \qquad (2.5.)$$

Da das Stoke'sche Gesetz jedoch nur für nichtsolvatisierte Kugeln gilt und bei Proteinen der Reibungskoeffizient zusätzlich von der Masse, Größe und Form der Moleküle abhängt, kann mit Gleichung 25.nur ein Mindestmolekulargewicht abgeschätzt werden. In Tabelle 7 sind einige Ergebnisse zusammengestellt.

Tabelle 7: Sedimentationskoeffizienten von C-Phycoerythrin und α- und ß-Untereinheit

Protein	Konzentration mg/ml	$s_{20^\circ,w}$ x 10^{-13}	Molekulargewicht*
C-PE	0,085	3,9	36 500
C-PE	0,117[a)]	4,2	40 150
C-PE	0,157	4,0	37 250
C-PE	0,240	3,9	36 500
C-PE	0,400	5,4	58 550
C-PE	0,436[a)]	5,4	58 550
C-PE	1,5	7,1	88 300
α-Untereinheit	0,485	2,4	17 700
ß-Untereinheit	0,440	2,6	19 800

a) in Tris-HCl Puffer pH 7,0; Ionenstärke 0,1

* nach Gleichung 2.5 (Elias 1961) berechnet.

Anhand der oben stehenden Tabelle kann monomerem C-Phycoerythrin ein Sedimentationskoeffizient von 3,9 S zugeordnet werden. Dieser liegt zwischen dem 3S Wert von monomerem C-Phycocyanin (30 000 Dalton, Kao et al. 1971; MacColl et al. 1971) und einem Sedimentationskoeffizienten von 4,3S für ein C-Phycoerythrin aus einer Cryptomonaden Species (54 300 Dalton, MacColl et al. 1976).

In der Literatur sind bisher nur folgende Sedimentationskoeffizienten für C-Phycoerythrin gefunden worden: Hattori und Fujita (1959) fanden eine 10,3S, 7S und bei pH 11,6 eine 2,2S Species, während Pecci und Fujimori (1968) Werte von 5,7S, 10,5S und 18S fanden. Für die 10S Spezies wurde ein Molekulargewicht von 226 000 Dalton ermittelt (Hattori et al. 1959), während alle anderen Werte nicht identifiziert sind. Wie aus den vorhergehenden Molekulargewichtsbestimmungen deutlich wurde, liegt C-Phycoerythrin aus Pseudanabaena W 1173 bei Konzentrationen über 0,25 mg/ml als Gemisch verschiedener Aggregationszustände vor, wobei die dimere Form vorherrscht. Bei der Bestimmung der Sedimentationskoeffizienten höherer Konzentrationen (~0,4 und 1,5 mg/ml)

war zu Beginn der Läufe eine gewisse Heterogenität erkennbar, welche aber im weiteren Verlauf verschwand, so daß bei keinem der Läufe zwei oder mehrere Komponenten identifiziert werden konnten. Die Übereinstimmung der 5 und 7S Werte mit den Literaturdaten deutet darauf hin, daß diese Sedimentationskoeffizienten definierten Aggregationszuständen des C-Phycoerythrins entsprechen. Demnach müßte die 5S Species dem Dimeren und die 7S Species dem Trimeren entsprechen, obwohl die berechneten Molekulargewichte deutlich darunter liegen (Tab. 7).
Die Sedimentationskoeffizienten der Untereinheiten entsprechen dagegen eindeutig den Monomeren und sind mit einem Wert von 2,3S für eine B-Phycoerythrin-Untereinheit (Fujimori, Pecci 1970) sowie S-Werten von 2,34 und 2,19 für α - und ß-Allophycocyanin-Untereinheiten (Bryant et al. 1976) durchaus vergleichbar.

3. Untersuchungen zur Energiewanderung im C-Phycoerythrin und in den renaturierten Untereinheiten

Die Energieübertragung wurde mit Hilfe der Fluoreszenzemissions- und excitationsspektroskopie bei Raum- und Tieftemperatur und mit Hilfe der Fluoreszenzpolarisationsgradspektroskopie untersucht.

3.1. Fluoreszenzpolarisation

Die Polarisation des Fluoreszenzlichts beruht darauf, daß das Übergangsmoment für einen Elektronenübergang zwischen Grund- und Anregungszuständen eine durch die Molekülgeometrie festgelegte Richtung hat. Nach Perrin (1929) ist der Polarisationsgrad definiert durch

$$P = \frac{I_{II} - I_I}{I_{II} + I_I} \qquad (3.1.)$$

wobei I_{II} und I_I die Intensitäten des emittierten Lichtes parallel und senkrecht zur Schwingungsrichtung des anregenden Lichtes sind. Befindet sich eine fluoreszierende Probe im Nullpunkt eines karthetischen Koordinatensystems und bestrahlt man diese in y-Richtung mit linear polarisiertem Licht, dessen elektrischer Vektor in Richtung der z-Achse schwingt, so werden aus der Gesamtheit statistisch orientierter Moleküle diejenigen angeregt, deren Übergangsdipole in Richtung der z-Achse liegen (Dörr 1966). Die Wahrscheinlichkeit der Anregung nimmt dabei mit zunehmendem Winkel zur Polarisationsrichtung ab (Abb. 6).

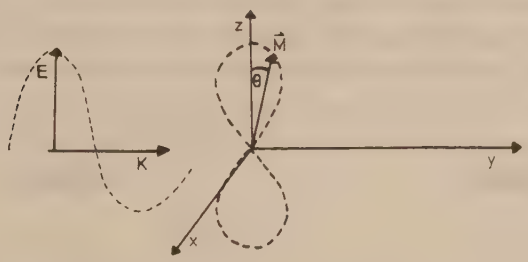

Abb. 6: Anregung mit linear polarisiertem Licht

Mit der in dieser Arbeit verwendeten Apparatur zur Polarisationsgradspektroskopie, deren Grundkonzeption von Dehler und Dörr (1965) entwickelt wurde, läßt sich der Polarisationsgrad direkt aus der Phasenverschiebung des Lichtes bestimmen. Aufbau und Meßprinzip sind bei Hechenbichler (1974) beschrieben.

Für den Polarisationsgrad der Fluoreszenz P gilt nach Perrin (1929)

$$P = \frac{3\cos^2\varphi - 1}{\cos^2\varphi + 3} \qquad (3.2.)$$

wobei φ den Winkel beschreibt zwischen der Richtung des absorbierenden und des emittierenden Übergangsdipolmoments.
Der Polarisationsgrad kann nach 3.2. Werte annehmen zwischen $+\frac{1}{2}$ für $\varphi = 0^\circ$ und $-\frac{1}{3}$ für $\varphi = 90^\circ$.

3.2. Depolarisationsmechanismen

a) molekülinterne

Bei organischen Molekülen in Lösung erfolgt der Übergang der Emission aus dem tiefsten angeregten Singulettzustand in den Grundzustand ($S_1 \longrightarrow S_o$).
Erfolgt Anregung im längstwelligen Absorptionsgebiet ($S_o \longrightarrow S_1$), bleibt das Fluoreszenzlicht nach Gleichung(3.2.) stark polarisiert, da Absorptions- und Emissionsübergangsdipolmoment die gleiche Richtung haben (Abb. 7 a).
Werden dagegen höhere Elektronenzustände angeregt, so erfolgt zunächst strahlungslose Relaxation bis in den Elektronenanregungszustand niedrigster Energie (S_1), wobei die Richtung der Elektronenoszillation um den Winkel φ gedreht wird (Förster 1951; Becker 1969). Dabei nimmt der Polarisationsgrad nach Gleichung (3.2.) ab (Abb. 7 b).

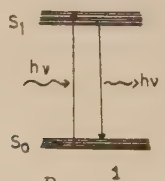

Abb. 7 a: Resonanzfluoreszenz

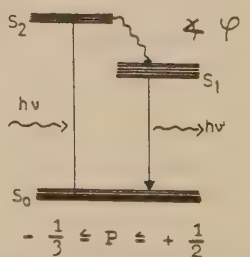

Abb. 7 b: nicht resonant

b) äußere Depolarisationsmechanismen

Die Fluoreszenzabklingungdauer organischer Moleküle liegt in den meisten Fällen im Nanosec.-Bereich. Ein auf die Fluoreszenzpolarisation verändernd wirkender Mechanismus muß also innerhalb dieser Zeitspanne ablaufen. In Lösung liegen je nach Versuchsbedingungen zwei Prozesse vor:
Rotationsdepolarisation und
Depolarisation durch Energiewanderung.
Bei den vorstehenden Ausführungen war angenommen worden, daß die Moleküle in der kurzen Zeit zwischen Absorption und Emission ihre Orientierung beibehalten. In wenig viskosen Lösungen können sich jedoch die Moleküle durch die Brown'sche Rotationsbewegung während dieser Zeitspanne drehen, so daß die relative Lage der Oszillatoren bezogen auf die Polarisationsrichtung des anregenden Lichtes verändert wird (Weber 1952) ("Rotationsdepolarisation"). Da dieser Prozeß viskositäts- und temperaturabhängig ist, läßt er sich durch geeignete Wahl der experimentellen Parameter steuern.

Zur Emission von weitgehend unpolarisiertem Licht kommt es außerdem bei höherer Konzentration und ausreichender Nähe der fluoreszierenden Moleküle, da unter diesen Bedingungen eine Übertragung der Anregungsenergie vom ursprünglich angeregten Molekül auf ein Nachbarmolekül anderer Orientierung möglich wird ("Konzentrationsdepolarisation nach Energieübertragung") (Weber 1954; Jablonski 1955; Knox 1968).
Erfolgt zum Beispiel Emission vom ursprünglich angeregten Molekül D(Donormolekül), so ist das Fluoreszenzlicht stark polarisiert, findet dagegen ein Transfer statt auf ein Molekül A (Akzeptormolekül), das in Lösung eine beliebige Orientierung zu D einnehmen kann, so geht diese ursprüngliche Polarisation verloren. Da mit zunehmender Konzentration der Moleküle der Abstand geringer und eine Energieübertragung damit wahrscheinlicher wird (siehe 3.3.), ist die Fluoreszenzpolarisation abhängig von der Konzentration der Lösung.

3.3. Theorie zur Energieübertragung

Bei fluoreszierenden Molekülen ist unter bestimmten Voraussetzungen, die im folgenden näher erläutert werden, eine Übertragung der Anregungsenergie möglich. Dabei kann die Anregungsenergie über eine beträchtliche Anzahl anderer Moleküle wandern, bevor Fluoreszenzdesaktivierung eintritt. Die Energiewanderung kann
a) zwischen gleichartigen Molekülen (Abb. 8a) und
b) zwischen verschiedenartigen Molekülen stattfinden (Abb. 8b).
Dieser Prozeß kann über verschiedene Mechanismen laufen:

1. Lichtemission des Donormoleküls und Reabsorption des Fluoreszenzlichtes vom Akzeptormolekül.

Voraussetzung dabei ist, daß das abgegebene Fluoreszenzlicht vom Akzeptormolekül absorbiert werden kann ($h\nu_{D^*} \approx h\nu_A$).

2. Strahlungslose Energieübertragung

Bei der klassischen Betrachtung der strahlungslosen Energieübertragung betrachtet man das angeregte Donormolekül (D^*) als schwingenden Dipoloszillator, der wie eine Antenne elektromagnetische Wellen aussendet. Sie regen das Akzeptormolekül (A) an, das als Empfänger wirkt. Dabei geht man davon aus, daß die vom Donormolekül abgegebene Leistung vom Akzeptormolekül aufgenommen wird (Förster 1951; Kuhn 1977). Dieser Prozeß verläuft ohne Masse- oder Ladungstransport, es entstehen keine freien Elektronen oder Radikale.

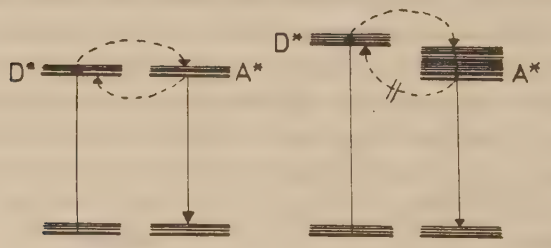

Abb. 8: Strahlungslose Energiewanderung: Abregung von D^* ist mit der Anregung von A gekoppelt.
a) zwischen gleichartigen Molekülen
b) zwischen verschiedenartigen Molekülen

Nach Förster (1951) müssen folgende Bedingungen erfüllt sein: a) Das Donormolekül muß mit einer ausreichend langen Lebensdauer fluoreszieren; b) der Abstand R zwischen Donor- und Akzeptormolekül darf nicht zu groß sein. Typische Abstände für diesen Prozeß der Energieübertragung liegen zwischen 10 und 100 Å. c) Das Fluoreszenzemissionsspektrum des Donormoleküls muß sich mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptormoleküls überlappen. d) Die relative Orientierung der Übergangsdipolmomente von Donor- und Akzeptormolekül müssen eine Wechselwirkung gewährleisten.

Für die Transferwahrscheinlichkeit $k_{D^* \rightarrow A}$ von D* nach A gilt folgende Gleichung (Förster 1951; Dörr 1977):

$$k_{D^* \rightarrow A} = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_o}{R}\right)^6 \qquad (3.3.)$$

Dabei ist τ_D die wirkliche (meßbare) Abklingdauer des Donormoleküls, die mit der natürlichen Lebensdauer τ_o und der Fluoreszenzquantenausbeute ϕ_F in Zusammenhang steht über:

$$\tau = \phi_F \cdot \tau_o \qquad (3.4.)$$

R_o ist der Abstand für den die Energieübertragung oder die spontane Desaktivierung von D* gleich wahrscheinlich ist.
Für R_o^6 gilt:

$$R_o^6 = \frac{C \times K^2 \times \phi_D}{n^4} \times I \qquad (3.5.)$$

K ist der Orientierungsparameter der Dipol-Dipol-Wechselwirkung, n der Brechungsindex des Lösungsmittels, ϕ_D die Fluoreszenzquantenausbeute des angeregten Donormoleküls. I ist ein Maß für die spektrale Überlappung des Emissionsspektrums von D* mit dem Absorptionsspektrum von A. Werden noch einige Schwingungsperioden der Kernschwingungen durchlaufen, bevor der Energietransfer stattfindet, so muß Gleichung (3.5.) noch durch ein Überlappungsintegral (Franck-Condon-Faktor) von Schwingungsfunktionen erweitert werden (Dörr 1977).

Findet eine Energieübertragung zwischen verschiedenartigen Molekülen statt, so wird eine Energiewanderung nur noch in einer Richtung möglich, nämlich vom energetisch höheren zum tieferen Zustand (Abb. 8 b). In diesem Fall wird die Transferrate zusätzlich durch das Überlappungsintegral zwischen dem Phononen-Grundzustand $\chi_{\{o\}}^{D^*}$ und dem angeregten Phononenzustand $\chi_{\{v\}}^{A}$ bestimmt (Abb. 8 b). Da man davon ausgehen kann, daß die Gleichgewichtslagen der "Gitterschwingungen" sich ändern, je nachdem ob Molekül D oder A angeregt ist, nehmen wir für das Überlappungsintegral eine Proportionalität zu

$$|\langle \chi_{\{o\}}^{D} \mid \chi_{\{v\}}^{A} \rangle|^2 \sim e^{-\gamma \Delta E} \qquad (3.6.)$$

an (Lin 1971). Da die beim Transfer angeregten Schwingungen des Mediums auf sehr schneller Zeitskala relaxieren, ist ein Rücktransfer unwahrscheinlich.

Bei Biliproteiden sind folgende Fälle der Energiewanderung im Prinzip möglich:

1. Es kann eine Wechselwirkung stattfinden zwischen Chromophoren innerhalb eines Proteinmoleküls ("intramolekulare Wechselwirkung")
2. Bei höherer Konzentration der Moleküle kann zusätzlich eine Wechselwirkung mit Chromophoren aus Nachbarmolekülen stattfinden ("intermolekulare Wechselwirkung")
3. Da Biliproteide in Abhängigkeit von der Ionenstärke, vom pH-Wert und von der Proteinkonzentration höhere Aggregate bilden, muß bei der Messung der Aggregationszustand mitberücksichtigt werden.
4. Da die Chromophore in verschiedenen oder in gleichen Energiezuständen vorliegen können, kann ein Energietransfer zwischen gleichartigen oder verschiedenen Molekülen stattfinden.

3.4. Ergebnisse

Wie bereits beschrieben, enthält das monomere C-Phycoerythrin fünf Chromophore vom Typ des Phycoerythrobilins, wobei zwei Chromophore auf der α-Untereinheit lokalisiert sind, die anderen drei auf der ß-Untereinheit.
Bei den folgenden Spektralmessungen wurden die Proteinkonzentrationen der untersuchten Lösungen so niedrig gewählt, daß keine Aggregate, sondern jeweils die monomeren Moleküle in Lösung vorlagen (siehe dazu Abschnitt 2.7.).

Die Spektraluntersuchungen des C-Phycoerythrins und der Untereinheiten sollten folgende Fragen klären:

1. Findet sowohl im C-Phycoerythrin als auch in den Untereinheiten eine intramolekulare Energiewanderung statt?
2. Gibt es verschieden absorbierende Zustände, die den von Dale and Teale (1970) postulierten 's'- und 'f'-Chromophoren (siehe Abschnitt 1.4.) entsprechen?

3.4.1. Polarisationsgradspektren der Fluoreszenzanregung

Abbildung 9 zeigt die im eingefrorenen Zustand und bei Raumtemperatur gemessenen Polarisationsgraderregerspektren zwischen 470 und 570 nm. Die Fluoreszenz wird bei 585 nm beobachtet. Die Absorptionsspektren sind ebenfalls dargestellt. Da die bei Raumtemperatur gemessenen Spektren innerhalb der angegebenen Fehlergrenze mit dem bei tiefer Temperatur gemessenen identisch sind, kann Rotationsdepolarisation ausgeschlossen werden.

Das Polarisationsgradspektrum der α-Untereinheit zeigt zwischen 470 und 545 nm einen nahezu konstanten Polarisationsgrad von ca. 0,23, dem sich ein steiler Anstieg anschließt, der bei 570 nm eine hohe Polarisation von 0,45 aufweist (Abb. 9). Dieser hohe Polarisationsgrad fällt mit dem langwelligen Maximum des Absorptionsspektrums zusammen.

Da der Polarisationsgrad bei 570 nm fast seinen positiven Extremwert annimmt, müssen Absorptionsübergangsmoment und Emissionsübergangsmoment die gleiche Richtung besitzen. Dies ist nur der

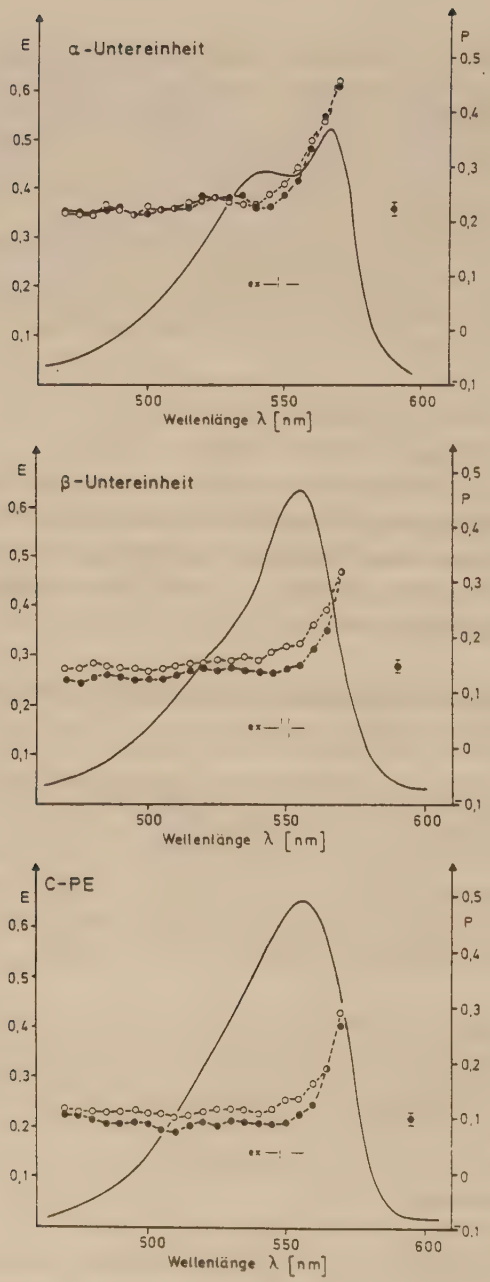

Abb. 9: Absorptionsspektren des C-Phycoerythrins und der α- und ß-Untereinheit in 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0 bei Raumtemperatur und Fluoreszenzpolarisationsgraderregerspektren in 0,1 M Natriumphosphatpuffer und Glycerin im Verhältnis 1:2, -o-o-o- bei Raumtemperatur, -●-●-●- im eingefrorenen Zustand (Kühlung mit flüssigem Stickstoff). Die Fluoreszenz wird bei 585 nm beobachtet.

Fall, wenn entweder Resonanzfluoreszenz (Abb. 7 a) vorliegt oder falls ein Energietransfer stattfindet, wenn die Moleküle translationsäquivalent angeordnet sind.

Das Absorptionsspektrum zeigt bei 545 nm einen zweiten Übergang. Im Bereich dieses Übergangs fällt der Polarisationsgrad auf einen Wert von 0,23 ab und bleibt dann konstant.
Der Übergang bei 545 nm, der den Polarisationsgrad so stark verändert, kann im Prinzip drei Ursachen haben:

a. Ein Schwingungsübergang des Chromophors
b. Ein weiterer Elektronenübergang des Chromophors
c. Ein zweiter Chromophor im Protein, der aufgrund einer anderen Struktur oder Umgebung bei höherer Energie absorbiert.

Wie die Untersuchungen von Muckle (1978) zeigen, liegen unterschiedliche Chromophorumgebungen im Protein vor, da für die beiden Chromophorbereiche der α-Untereinheit unterschiedliche Aminosäuresequenzen gefunden wurden.
Fall a. trifft nicht zu, weil bei einem voll erlaubten Übergang, der hier vorliegt (hohe Oszillatorstärke), nur totalsymmetrische Schwingungen eine Rolle spielen, die jedoch die Polarisation nicht ändern.
Dies bestätigt das Polarisationsgradspektrum des Phycoerythrobilin-Zinkkomplexes (Teale, Dale 1970), das über den gesamten Bereich der langwelligen Absorptionsbande einen nahezu konstanten Polarisationsgrad zeigt.

Einen zweiten Elektronenübergang (Fall b.) in diesem Bereich schließen wir aufgrund der MO-Berechnungen von Falk und Mitarbeitern (1977 b) an einem verwandten Biliviolin aus (vgl. Diskussion 2.5.2.).

Bleibt Fall c. als Ursache für den Übergang im Absorptionsspektrum. Da die Anregung dieses zweiten Chromophors die Polarisation ändert, muß ein nichtresonanter Energietransfer von diesem höheren Zustand auf den nieder-energetischen stattfinden. Aus dem Polarisationsgradspektrum folgt, daß die Chromophore nicht translationsäquivalent angeordnet sind.

Nach Dale und Teale (1970) bezeichnen wir den kurzwellig absorbierenden Chromophor als 's'-Chromophor und den langwellig absorbierenden als 'f'-Chromophor.
Die Polarisationsgradspektren der ß-Untereinheit und des C-Phycoerythrins weisen die gleiche Charakteristik auf wie das der α-Untereinheit. Rotationsdepolarisation kann ebenfalls ausgeschlossen werden (siehe Abb. 9).
Auch hier erfolgt ab 545 nm ein steiler Anstieg, der hohe Grenzpolarisationsgrade anzeigt. Der Polarisationsgrad bleibt im kurzwelligen Spektralbereich ähnlich konstant wie bei der α-Untereinheit, nimmt aber in der Reihenfolge α-ß-PE ab, d.h. mit zunehmender Chromophorzahl erfolgt sukzessive Depolarisation. Den Anstieg des Polarisationsgrades ab 545 nm interpretieren wir wiederum als Resonanzfluoreszenz (Abb. 7 a) eines oder mehrerer 'f'-Chromophore. Der Polarisationsgrad liegt hier zwar niedriger als bei der α-Untereinheit. Bei höherer Chromophorzahl, drei bei der ß-Untereinheit und fünf im C-Phycoerythrin, ist jedoch mit einer stärkeren Überlappung der Absorptionsspektren der einzelnen Chromophore zu rechnen. Deswegen wird eine getrennte Anregung eines 'f'-Chromophors nicht mehr möglich sein. Bei Anregung im kürzerwelligen Spektralbereich scheinen im wesentlichen Chromophore des 's'-Typs angeregt zu werden. Die stärkere Depolarisation des Fluoreszenzlichtes ist somit als Folge eines Energietransfers von 's'- zu 'f'-Chromophoren zu interpretieren.

Ein sehr ähnliches Polarisationsgradspektrum wie das der α-Untereinheit wurde für monomeres C-Phycocyanin gefunden (Vernotte 1971; MacColl et al. 1971). Im Gegensatz dazu sind die Polarisationsgradspektren der Allophycocyanin-Untereinheiten, die nur einen Chromophortyp enthalten, konstant und hoch. Unterschiedliche Polarisationsgrade, die 's'- oder 'f'-Chromophore anzeigen würden, wurden nicht gefunden (Cohen-Bazire et al. 1977).

Die Polarisationsgradspektren im UV-Bereich (Abb. 10) zeigen weitere Elektronenübergänge bei 390 nm, zwischen 335 und 325 nm und einen weiteren zwischen 310 und 300 nm. Diese Übergänge stimmen in der Lage recht gut überein mit denen aus PPP-Rechnungen ermittelten Elektronenübergängen eines verwandten Biliviolins (Falk 1977 b).

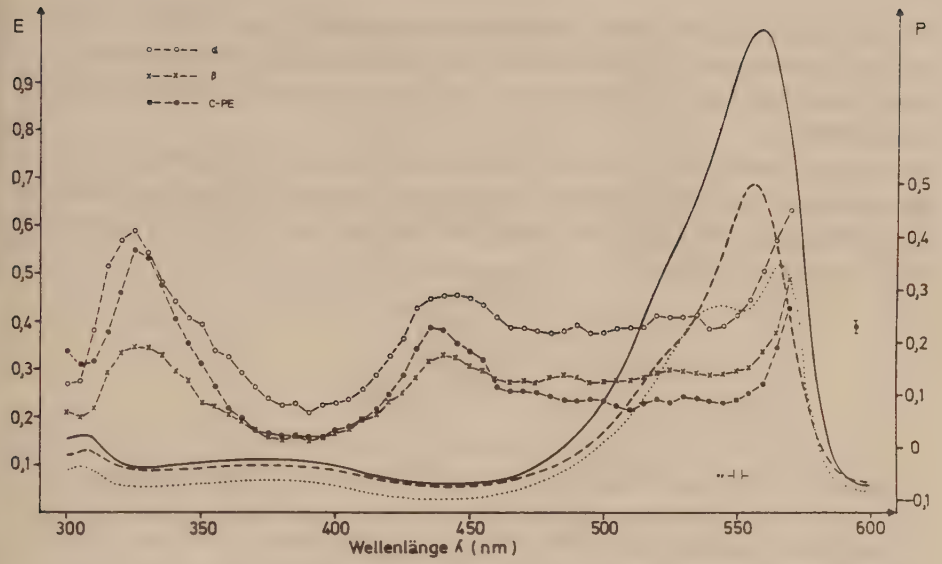

Abb. 10: Absorptionsspektren (..... α-Untereinheit, ------ ß-Untereinheit, ——— C-Phycoerythrin bei Raumtemperatur und Fluoreszenzpolarisationsgraderregerspektren (-o-o-o- α-Untereinheit, -x-x-x- ß-Untereinheit, -●-●-●- C-Phycoerythrin) im eingefrorenen Zustand. Lösungsmittel siehe Abb. 9.

Die hohen Polarisationsgrade sowohl in der sichtbaren Absorptionsbande wie im UV-Bereich zeigen, daß keine intermolekulare Energieübertragung auf Nachbarmoleküle stattfindet. Bei einer statistischen und homogenen Verteilung der Akzeptormoleküle geht nach erfolgtem Energietransfer die anfängliche Polarisation nahezu vollständig verloren, da über alle Orientierungen gemittelt werden muß (Knox 1968).

Findet ein Energietransfer nur zwischen 's'- und 'f'-Chromophoren innerhalb eines Proteinmoleküls statt, so hängt die Depolarisation nach erfolgtem Energietransfer nur von der gegenseitigen Orientierung der miteinander wechselwirkenden Chromophore ab und ist vom Transfermechanismus selbst unabhängig. Da die Chromophore starr im Protein fixiert sind (Cohen-Bazire et al. 1977),

ist die Orientierung der Übergangsdipolmomente zueinander durch die Konformation der Chromophore im Protein festgelegt. Damit läßt sich die Depolarisation auf die Perrin'sche Beziehung (3.2.) zurückführen.
Mit dieser Modellvorstellung lassen sich auch die Maxima im UV-Bereich und auch die Tatsache erklären, daß der Polarisationsgrad im C-Phycoerythrin fast so hoch ist wie bei der α-Untereinheit (Abb. 10, bei 325 nm).

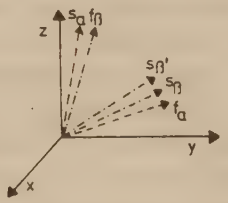

Abb. 11: Gegenseitige Orientierung der Übergangsdipolmomente (-----) im C-Phycoerythrin (Modell zur Erläuterung der Depolarisation, siehe Text).

Stellt man sich zum Beispiel folgende gegenseitige Orientierung der Übergangsdipolmomente wie in Abb. 11 vor, so wäre der Polarisationsgrad für die α-Untereinheit durch den Winkel zwischen $\vec{s}_\alpha$ und $\vec{f}_\alpha$ bestimmt und bei der ß-Untereinheit durch die Winkel $\vec{f}_\beta\vec{s}_\beta$ und $\vec{f}_\beta\vec{s}_{\beta'}$. Im C-Phycoerythrin müßte man noch zusätzlich über die Orientierung von $\vec{s}_\alpha\vec{f}_\beta$, $\vec{s}_\beta\vec{f}_\alpha$ und $\vec{s}_{\beta'}\vec{f}_\alpha$ mitteln. Da in diesem Fall $\vec{s}_\alpha$ relativ parallel zu $\vec{f}_\beta$ liegt und ebenso $\vec{s}_{\beta'}$ und $\vec{s}_\beta$ relativ parallel zu $\vec{f}_\alpha$ liegt, wären diese Übergänge bevorzugt, und da die Anordnung parallel ist, müßte der Polarisationsgrad hoch sein.

3.4.2. Polarisationsgradspektren der Fluoreszenzemission

Die Polarisationsgradspektren der Fluoreszenzemission (Abb. 12) sind im Gegensatz zu den Polarisationsgradspektren der Fluoreszenzanregung ziemlich konstant im Bereich der Bande. Das ist zu erwarten, wenn nur ein Chromophor bzw. gleiche Chromophore fluoreszieren, wie in der α- oder ß-Untereinheit (siehe Abschnitt 3.4.3.). Im C-Phycoerythrin ist dagegen ein geringer Anstieg im

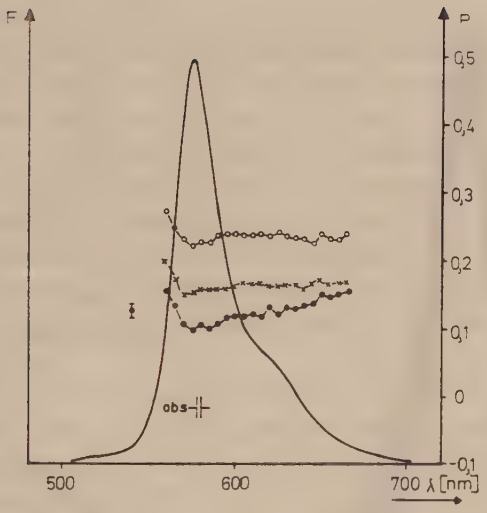

Abb. 12: Fluoreszenzemissionsspektrum des C-Phycoerythrins in 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0 und Fluoreszenzpolarisationsgrademissionsspektren des C-Phycoerythrins (-•-•-•-) sowie der α-Untereinheit (-o-o-o-) und der ß-Untereinheit (-x-x-x-). Lösungsmittel siehe Abb. 9. Die Anregungswellenlänge ist 500 nm.

langwelligen Spektralbereich zu erkennen. Dieser Anstieg der Polarisation zum langwelligen Ende hin ist darauf zurückzuführen, daß die Linienbreite des 'f'-Chromophors der ß-Untereinheit hier größer ist (Abb. 13, Abschnitt 3.4.3.) als die der α-Untereinheit, wir also zum größeren Anteil die Polarisation der Fluoreszenzemission des 'f'-Chromophors von der ß-Untereinheit messen. Konstante Polarisationsgrade der Fluoreszenzemission wurden für die α- und ß-Untereinheit des Allophycocyanins (Cohen-Bazire et al. 1977) sowie für monomeres C-Phycocyanin gefunden (Vernotte 1971).

3.4.3. Fluoreszenzemissionsspektren

Die Fluoreszenzemissionsspektren vom C-Phycoerythrin und von den Untereinheiten sind fast identisch im Hinblick auf die Lage des Maximums und die Linienform (Abb. 13, Abb. 14). Daraus folgt, daß der fluoreszierende Zustand aller drei Proteine die gleiche

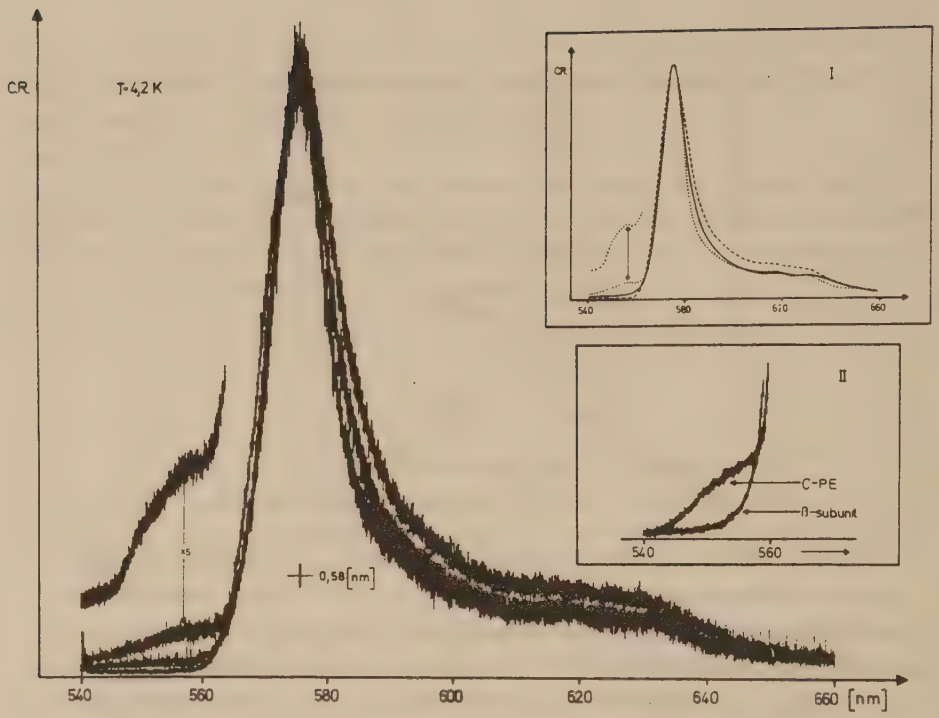

Abb. 13: Fluoreszenzemissionsspektren des C-Phycoerythrins und der α - und ß-Untereinheit bei 4,2 K in 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0 und Glycerin 1:2. Die Anregungswellenlänge ist 520 nm.Bild I zeigt den Verlauf der drei Spektren. (——— C-Phycoerythrin, --- ß-Untereinheit, ... α-Untereinheit) Bild II zeigt die Fluoreszenzemission der ß-Untereinheit und des C-Phycoerythrins zwischen 540 und 560 nm, wobei die Photonenzählrate um den Faktor 20 erhöht wurde.

Energie hat. Das bedeutet auch, daß die 'f'-Chromophore unverändert bleiben bei der Assoziation der Untereinheiten zum C-Phycoerythrin (αß-Monomer).
Die Emissionsspektren von der α - und ß-Untereinheit im Allophycocyanin sind ebenfalls nahezu identisch. Im Gegensatz dazu ist das Fluoreszenzemissionsspektrum des nativen, trimeren Allophycocyanins langwellig verschoben (Gysi, Zuber 1974; Cohen-Bazire et al. 1977).

Vergleicht man jedoch die Fluoreszenzemissionsspektren bei 4,2 K (Abb. 13), so werden geringe Unterschiede deutlich: 1. Bei der α-Untereinheit ist eine kleine Schulter (556 nm) vor der Hauptemissionsbande zu erkennen. Wir interpretieren diese schwache Fluoreszenz als Emission des höher energetischen Chromophors ('s'-Chromophors). Vergleicht man diesen Spektralbereich beim C-Phycoerythrin und bei der ß-Untereinheit (siehe Bild II, Abb. 13), so ist im C-Phycoerythrin noch eine sehr geringe Emission sichtbar, während bei der ß-Untereinheit die Photonenzählrate nahe bei null ist.
Da aus den Polarisationsgradspektren hervorgeht, daß sowohl im C-Phycoerythrin und in den Untereinheiten Chromophore des 's' und 'f'-Typs vorhanden sind, folgt aus den Emissionsspektren, daß der Energietransfer im Vergleich zur Eigenemission der 's'-Chromophore sehr schnell ist, da fast keine 's'-Fluoreszenz zu erkennen ist. Die Emissionsspektren sind auch unabhängig von der Erregerwellenlänge.

Außerdem unterscheiden sich die Linienbreiten der Emissionsbanden Während die der ß-Untereinheit am breitesten ist, liegt die des C-Phycoerythrins zwischen α- und ß-Untereinheit. Das bedeutet, daß die Emissionsbande des C-Phycoerythrins eine Überlagerung der Fluoreszenz der Untereinheiten ist. Demnach fluoreszieren im C-Phycoerythrin sowohl der 'f'-Chromophor der α-Untereinheit wie auch der der ß-Untereinheit. Die unterschiedlichen Linienbreiten sind auch bei Raumtemperatur zu erkennen (Abb. 14).

Die Spiegelsymmetrie zwischen Absorptionsspektrum und Fluoreszenzemissionsspektrum, die bei organischen Molekülen in Lösung i n erster Näherung für den $S_1 \longrightarrow S_o$-Übergang gilt, ist im Falle der α-Untereinheit und des C-Phycoerythrins weitgehend aufgehoben (Abb. 14). Da mehr als ein Chromophor in den Molekülen vorhanden ist, bestätigt dies, daß es Chromophore gibt, die zwar absorbieren, aber nicht emittieren.

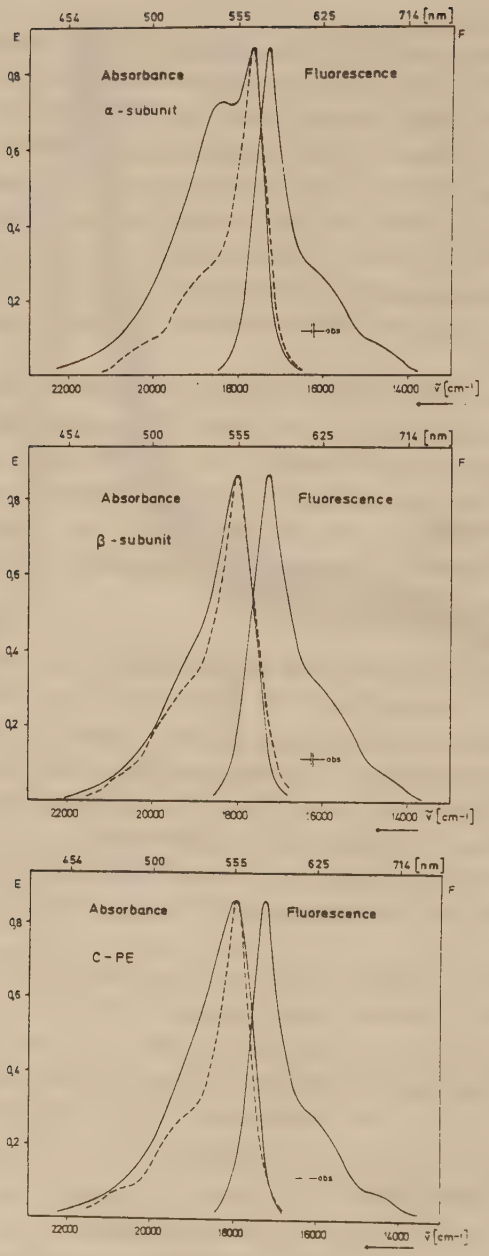

Abb. 14: Absorptions- und Fluoreszenzemissionsspektren (korrigiert) vom C-Phycoerythrin und der α- und ß-Untereinheit bei Raumtemperatur in 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0. Die Anregungswellenlänge ist 515 nm (19 417 cm^{-1}). Die gestrichelten Linien sind die Spiegelbilder der Fluoreszenzemission. Die Spektren wurden linear in $\tilde{\nu}$ gezeichnet, um Absorptions- und Fluoreszenzspektren miteinander vergleichen zu können.

3.4.4. Fluoreszenzquantenausbeuten als Funktion der Erregerwellenlänge

Da die Fluoreszenzquantenausbeuten im C-Phycoerythrin und in den Untereinheiten relativ hoch sind (Tab. 4, Abschnitt 2.6.) und unabhängig von der Erregerwellenlänge (Abb. 15), folgt daraus, daß die von 's'-Chromophoren absorbierte Energie mit hoher Effektivität zu den 'f'-Chromophoren transferiert wird.

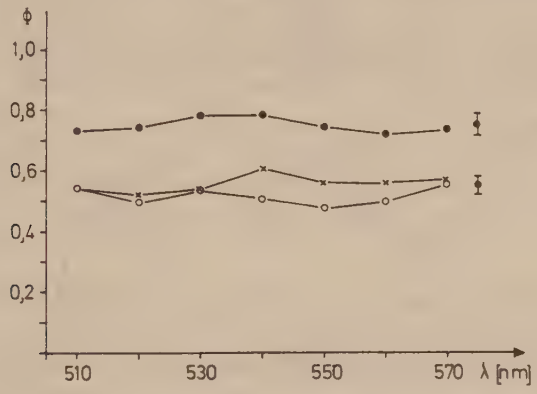

Abb. 15: Absolute Fluoreszenzquantenausbeuten als Funktion der Anregungswellenlänge. -●-●-●- C-Phycoerythrin, -o-o-o- α-Untereinheit -x-x-x- ß-Untereinheit.

3.4.6. Fluoreszenzerregerspektren

Die Übereinstimmung der Fluoreszenzerregerspektren (Abb. 16) mit den Absorptionsspektren im Bereich der Hauptabsorptionsbande zeigt wiederum, daß der Energietransfer von 's'- zu 'f'-Chromophoren sehr effizient ist.
Die Fluoreszenzspektren bei 4,2 K (Abb. 17) wurden aufgenommen, um die Banden der einzelnen Chromophore identifizieren zu können. Das Spektrum der α-Untereinheit zeigt eine deutliche Aufspaltung, die, würde man die Linien weiterverfolgen, zwei verschiedene Absorptionskurven andeuten. Die kurzwellige Bande ist breit und hat Ähnlichkeit mit dem Chromophorspektrum bei denaturiertem Protein, während die langwellige Bande eher spiegelsymmetrisch

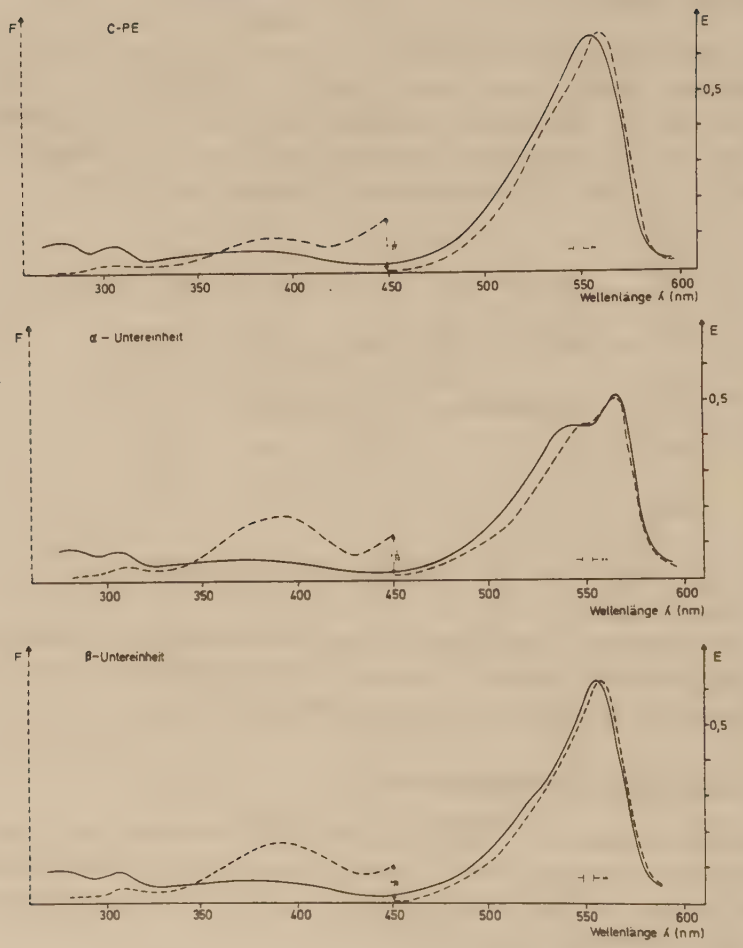

Abb. 16: Absorptions- (———) und Fluoreszenzerregerspektren (-----) des C-Phycoerythrins und der α- und ß-Untereinheit in 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0 bei Raumtemperatur. Die Fluoreszenz wurde bei 620 nm beobachtet.

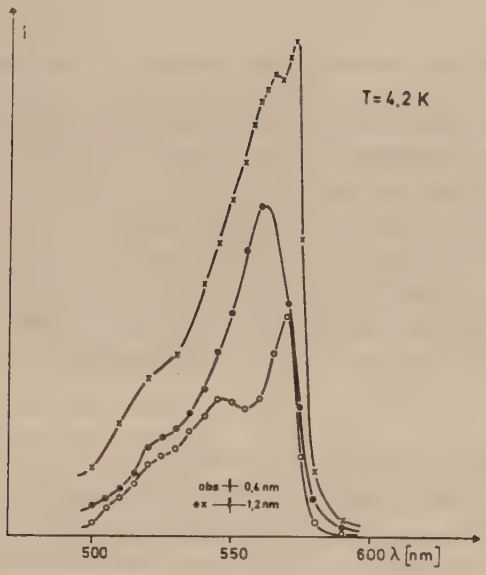

Abb. 17: Fluoreszenzerregerspektren des C-Phycoerythrins (-x-x-x-) und der α-(-o-o-o-) und ß-(-●-●-●-)Untereinheit bei 4,2 K in 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0 und Glycerin im Verhältnis 1:2. Die Beobachtungswellenlänge ist 618 nm.

zur Fluoreszenzemissionsbande erscheint.
Bei der ß-Untereinheit wird im kurzwelligen Spektralbereich eine ausgeprägte Schulter sichtbar, die wir als einen in diesem Bereich absorbierenden Chromophor interpretieren.
Das Maximum des C-Phycoerythrins spaltet in zwei schmale Banden auf (7 nm Abstand). Die Maxima der drei Erregerspektren stimmen nicht miteinander überein.

3.5. Diskussion

Die nahezu vollständige Überlappung zwischen Absorptions- und Erregerspektren, die fehlende Spiegelsymmetrie und die Fluoreszenzpolarisationsgraderregerspektren zeigen, daß in den Untereinheiten und im C-Phycoerythrin ein Energietransfer von 's' zu 'f'-Chromophoren stattfindet. Die Unabhängigkeit der Fluoreszenzquantenausbeute als Funktion der Erregerwellenlänge und das fast vollständige Fehlen einer Emission von 's'-Chromophoren bestätigen, daß der Energietransfer mit einer Wahrscheinlichkeit nahe bei 1 abläuft.

Im Falle der α-Untereinheit beobachten wir eine geringe Abweichung: Die Deckung des Erregerspektrums mit dem Absorptionsspektrum ist im kurzwelligen Absorptionsbereich (von 500-540 nm; Abb. 16) weniger gut erfüllt. Bei tiefen Temperaturen (Abb. 13) wird eine geringe Eigenemission des 's'-Chromophors sichtbar. Das heißt, daß das Konzept von 's'- (sensitisierend) und 'f'-Chromophor nicht mehr streng erfüllt ist. Dennoch benützen wir im folgenden die Terminologie weiter.
Im Gegensatz dazu wird keine 's'-Fluoreszenz in der ß-Untereinheit sichtbar (Abb. 13, Bild II). Daraus folgt, daß die Transferrate in der ß-Untereinheit höher ist, als in der α-Untereinheit. Nach Gleichung (3.6.) nimmt die Transferrate zu, je geringer die Energielücke zwischen den miteinander wechselwirkenden Zuständen ist. In der α-Untereinheit beträgt diese etwa 800 cm^{-1} (20 nm, Abb. 16). In der ß-Untereinheit läßt die Erhöhung der Transferrate vermuten, daß ein weiterer Chromophor dazwischen liegt, so daß die Energielücke verringert ist. Die Entfaltung des Absorptionsspektrums, die im folgenden Abschnitt erläutert wird, bestätigt dies.
Im C-Phycoerythrin ist die Emission im kurzwelligen Spektralbereich stark reduziert (Abb. 13). Daraus folgt, daß die Energie von der α-Untereinheit auf die ß-Untereinheit übertragen wird. Das Polarisationsgradspektrum des C-Phycoerythrins ist ein weiterer Beweis, daß die Energie zwischen den Untereinheiten ausgetauscht wird. Würde die Energie nur innerhalb der Untereinheiten transferiert werden, so müßte der Polarisationsgrad zwischen

dem der α - und der ß-Untereinheit liegen, da der beobachtete Polarisationsgrad eine Überlagerung von α und ß wäre. Abbildung 10 zeigt klar, daß dies nicht zutrifft.
Im C-Phycoerythrin wie in den Untereinheiten zeigt das Polarisationsgradspektrum im Bereich der sichtbaren Absorptionsbande ein charakteristisches Bild: Konstante Polarisation zwischen 450-550 nm und Anstieg am langwelligen Absorptionsende. Es erhebt sich die Frage, ob diese Polarisationsgradspektren vereinbar sind mit dem Modell von 's'- und 'f'-Chromophoren, die bei unterschiedlicher Energie absorbieren und beim C-Phycoerythrin mit einem Energietransfer zwischen Chromophoren der α - und der ß-Untereinheit. Um diese Frage zu klären, wurden die Polarisationsgradspektren unter den im folgenden beschriebenen Annahmen berechnet.
Zur Berechnung wird der Polarisationsgrad (P) in den Anisotropiegrad (R) umgerechnet, der mit P über

$$R = \frac{2P}{3-P} \qquad (3.7.)$$

zusammenhängt (Knox 1968). Da R eine additive Größe darstellt (Weber 1952), läßt sich die Polarisation einer Lösung beschreiben durch

$$R = \sum_n f_n R_n \qquad (3.8.)$$

Hierbei ist R_n die Polarisation des emittierten Lichtes einer gegebenen Emitterteilmenge n und f_n der von der Teilmenge beigetragene Bruchteil der Gesamtpolarisation.

Liegen mehrere absorbierende und emittierende Zustände vor, deren Absorptionsspektren sich überlappen, so ist die Gesamtpolarisation nach Gleichung (3.8.) gegeben durch:

$$R = \frac{\sum_j \varepsilon_j (\lambda) R_j}{\sum_j \varepsilon_j (\lambda)} \qquad (3.9.)$$

Der Anisotropiegrad R_j, der nach Anregung des j'ten Chromophors erhalten wird, hängt dabei von der Orientierung ab, den der absorbierende Zustand zum emittierenden einnimmt und variiert zwischen + 0,4 und - 0,2, entsprechend paralleler oder senkrechter Anordnung der Übergangsdipolmomente. Der Anisotropiegrad R für Resonanzfluoreszenz wurde mit 0,353 angenommen, entsprechend dem gemessenen Polarisationsgrad von 0,45 bei 570 nm bei der α-Untereinheit. Bei der Berechnung wird die Transferwahrscheinlichkeit von 's'- zu 'f'-Chromophoren mit 1 angenommen. Die Summe ε_j entspricht den Absorptionsbanden der 's'- und 'f'-Chromophore. Da diese jedoch experimentell nicht zu ermitteln sind, wurde eine Entfaltung der α- und ß-Absorptionsspektren durchgeführt.

Zwei Möglichkeiten der Entfaltung wurden für die α-Untereinheit durchgeführt:

1. Zerlegung der Absorptionsbande in zwei Gaußkurven (Abb. 18, Computerfit)
2. Es wurde eine Spiegelsymmetrie des 'f'-Absorptionsspektrums zur Fluoreszenzemissionsbande angenommen (siehe Abb. 20). Die zweite Absorptionskurve ergibt sich dann aus der Differenz zum α-Gesamtspektrum.

Unter der Voraussetzung, daß beide Chromophore gleiche Oszillatorenstärken besitzen (Abschnitt 2.5.2.), wurde das Absorptionsspektrum jeweils in zwei Kurven etwa gleichen Flächeninhalts zerlegt. Zu Abb. 18:
Das Absorptionsspektrum ließ sich nur mit unsymmetrischen Gauß-Kurven mit einseitigem exponentiellem Abfall fitten.
Die Maxima der Absorptionsbanden stimmen in der Lage recht gut mit der Aufspaltung im Fluoreszenzerregerspektrum (siehe Abb. 17) überein.

Versucht man das ß-Absorptionsspektrum mit den beiden Linien der α-Untereinheit zu fitten, wobei jeweils eine von beiden mit doppeltem Flächeninhalt eingeht, entsprechend drei Chromophoren, so erhält man eine recht große Abweichung. Ein guter Fit für die ß-Untereinheit ist nur möglich durch Variation der Schwerpunkte,

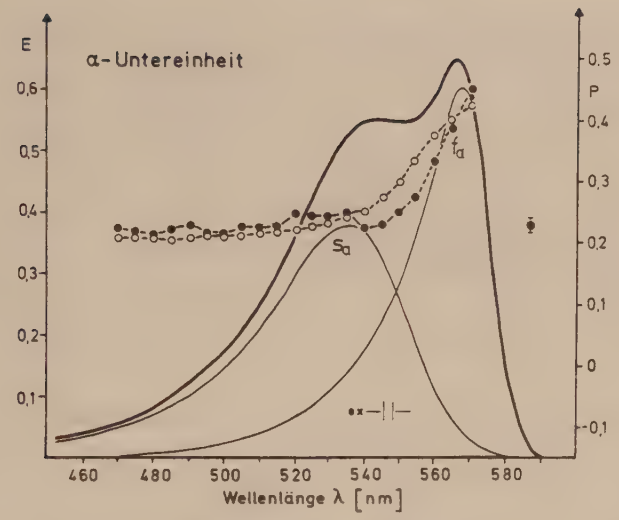

Abb. 18: In Gauß-Kurven entfaltetes Absorptionsspektrum der α-Untereinheit (siehe Text) und Fluoreszenzpolarisationsgradspektren, -●-●-●- experimentelle Werte, -o-o-o- nach Gleichung (3.9.) berechnete Werte.

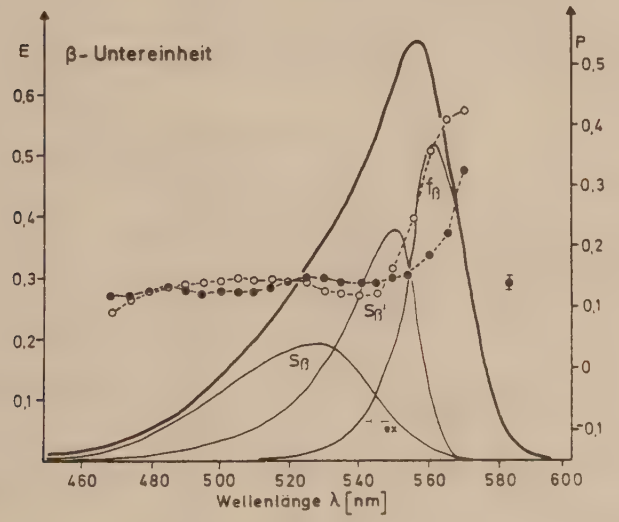

Abb. 19: In Gauß-Kurven entfaltetes Absorptionsspektrum der ß-Untereinheit (siehe Text) und Fluoreszenzpolarisationsgradspektren, -●-●-●- experimentelle Werte, -o-o-o- nach Gleichung (3.9.) berechnete Werte.

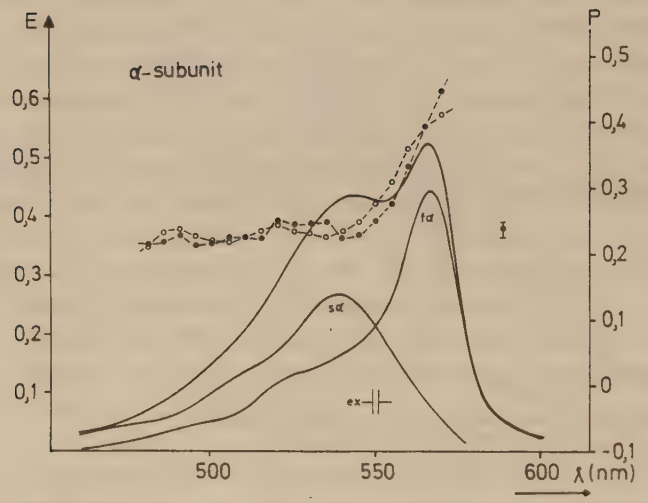

Abb. 20: Entfaltetes Absorptionsspektrum der α-Untereinheit (siehe Text) und experimentelles und berechnetes Fluoreszenzpolarisationsgradspektrum (Legende siehe Abb. 18). Die Entfaltung des Absorptionsspektrums wurde mit Hilfe des korrigierten Fluoreszenzemissionsspektrums linear über $\tilde{\nu}$ durchgeführt. Zum Vergleich wurden die Spektren über λ dargestellt.

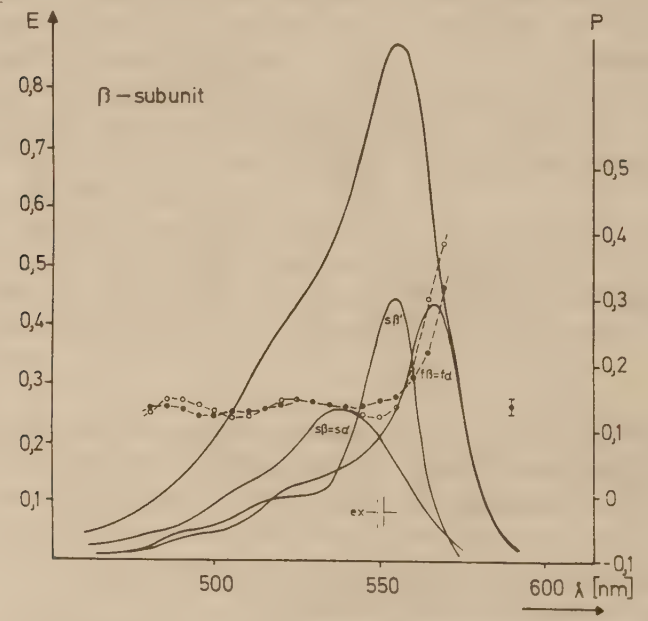

Abb. 21: Entfaltetes Absorptionsspektrum der ß-Untereinheit (siehe Text) und experimentelles und berechnetes Fluoreszenzpolarisationsgradspektrum (Legende siehe Abb. 18). Zur Entfaltung siehe Abb. 20.

also Verschiebung der Absorptionsmaxima oder durch Einführung einer dritten Bande. Damit wird die Entfaltung zwar willkürlicher als bei der α-Untereinheit. Es beweist jedoch, daß mindestens ein weiterer Zustand im Gesamtprotein vorhanden ist.

Es wurden wiederum zwei Entfaltungen durchgeführt:

1. Zerlegung in drei Gauß-Kurven (siehe Abb. 19, Computerfit)
2. Es wurde angenommen, daß in der ß-Untereinheit zwei Chromophore identisch sind mit denen nach Abb. 20 erhaltenen der α-Untereinheit (siehe Abb. 21). Der dritte Chromophor (mittlere Kurve) ergibt sich aus der Differenz zum ß-Absorptionsspektrum.

Die zweite Entfaltung enthält die Annahme, daß die Fluoreszenzemission aus demselben Zustand kommt wie bei der α-Untereinheit (Abb. 13, 14). Im wesentlichen erhält man durch die Entfaltung zwei verschiedene Kurventypen, einen breiten Kurventyp, der den Chromophorspektren bei denaturiertem Protein ähnelt und einen hohen, schmalen.

Da die Absorptionsbande des C-Phycoerythrins eine Überlagerung der Absorptionsspektren der Untereinheiten ist (Abschnitt 2.5.2.), erhält man die Banden der einzelnen Chromophore ebenfalls durch Addition der entfalteten α- und ß-Absorptionsspektren. Für das C-Phycoerythrin ergeben sich dann die in Abb. 22 und 23 dargestellten Banden.

Mit Hilfe dieser Absorptionskurven (Abb. 18-23) wurden die Polarisationsgradspektren nach Gleichung 3.9. berechnet.

Im Falle der α- und ß-Untereinheit konnte aus den Anisotropiegraden, die durch die Polarisationsgradberechnung erhalten wurden, nach Gleichung (3.2.) der Winkel zwischen den Übergangsdipolmomenten der 's'- und 'f'-Chromophore berechnet werden. Folgende Winkel wurden erhalten:

<u>α-Untereinheit</u>	$\vec{s}_\alpha \vec{f}_\alpha$	43°	(Abb. 18)
	$\vec{s}_\alpha \vec{f}_\alpha$	49°	(Abb. 20)
<u>ß-Untereinheit</u>	$\vec{s}_ß \vec{f}_ß$	39° und $\vec{s}_ß, \vec{f}_ß$ 57°	(Abb. 19)
	$\vec{s}_ß \vec{f}_ß$	54° und $\vec{s}_ß, \vec{f}_ß$ 57°	(Abb. 21)

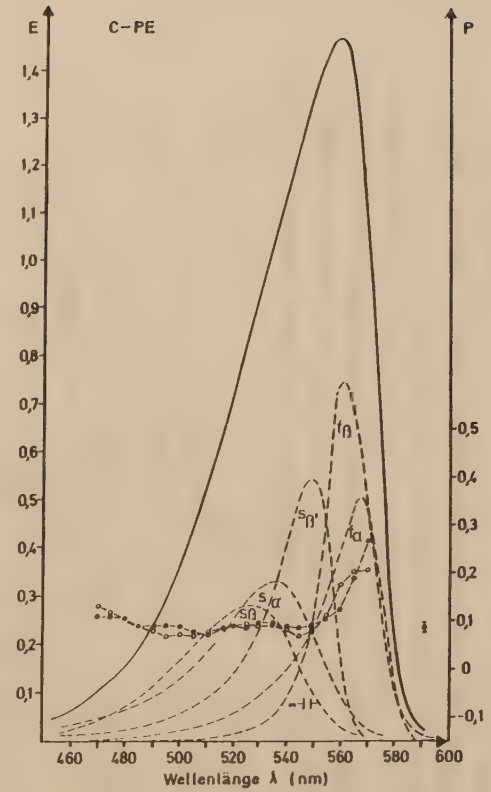

Abb. 22: In Gauß-Kurven entfaltetes Absorptionsspektrum des C-Phycoerythrins und experimentelles und berechnetes Fluoreszenzpolarisationsgradspektrum (Legende siehe Abb. 18). Vergleiche hierzu Text Seite 55.

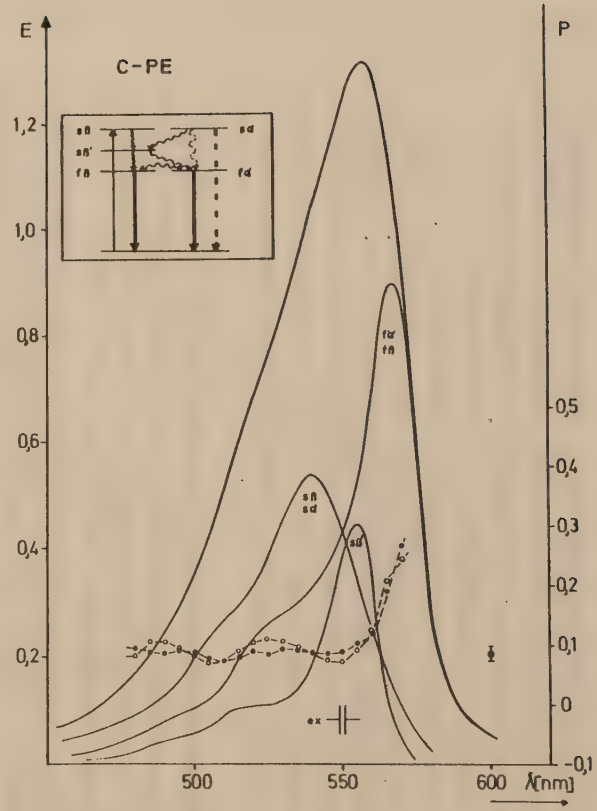

Abb. 23: Entfaltetes Absorptionsspektrum des C-Phycoerythrins (siehe Text) und experimentelles und berechnetes Fluoreszenzpolarisationsgradspektrum (Legende siehe Abb. 18). Das Bild innen zeigt das Energieschema der Chromophore sowie die Energietransfer- und relaxationswege. Zur Entfaltung siehe Abb.20.

Für die Berechnung der Polarisation beim C-Phycoerythrin nach Abb. 23 muß mitberücksichtigt werden, daß sowohl der 'f_α' wie der 'f_β'-Chromophor fluoresziert (siehe Abb. 13 und 14). Demnach lassen sich die in Abb. 23, Bild innen, dargestellten Energietransfer- und Relaxationswege ableiten. Gleichung (3.9.) muß in diesem Fall mit einem Gewichtskoeffizienten p erweitert werden, der die Wahrscheinlichkeit angibt, mit der die Energie auf f_α bzw. f_β übertragen wird. P variiert demnach zwischen 0 und 1. Da wir die Wahrscheinlichkeiten nicht kennen, kann nur über die Summe der Anisotropiegrade gemittelt werden, die durch die Orientierung des entsprechenden 's'-Chromophors zu beiden 'f'-Chromophoren gegeben ist. Der Winkel zwischen den Übergangsdipolmomenten kann deshalb nicht berechnet werden.
Die Übereinstimmung der experimentellen Daten mit den berechneten bestätigt die zweite Entfaltung (Abb. 20, 21, 23) und die postulierten Energietransferwege im C-Phycoerythrin (Abb. 23, Bild innen). Bei der Entfaltung in Gauß-Kurven sind die Abweichungen größer. Vor allem bei der ß-Untereinheit ist die Abweichung im langwelligen Absorptionsbereich erheblich (Abb. 19). Da aus den Fluoreszenzemissionsspektren hervorgeht, daß die 'f'-Chromophore sowohl in den Untereinheiten wie auch im C-Phycoerythrin bei gleicher Energie emittieren und entsprechend auch absorbieren, entspricht die Computerentfaltung des C-Phycoerythrins (Abb. 22) nicht den experimentellen Ergebnissen. Sie wurde nur zum Vergleich mit aufgeführt.

Aufgrund der Ergebnisse haben wir einen Einblick in die Energiezustände der Chromophore im C-Phycoerythrin und in die möglichen Transfer- und Relaxationswege gewonnen. Das Konzept von 's'- und 'f'-Chromophoren konnte bestätigt und erweitert werden und die Einschränkungen bei tiefen Temperaturen wurden diskutiert. In den untersuchten Molekülen hängt die Depolarisation nicht mehr vom Transfermechanismus selber ab, sondern vom Winkel zwischen absorbierendem und emittierendem Übergangsdipolmoment.

Welche biologische Bedeutung steht hinter diesem intramolekularen Energietransfer?

Die wesentlichste Bedeutung besteht wohl darin, daß die absorbierte Lichtenergie in einer bestimmten Richtung im Sinne einer Einbahnstraße durch das Molekül geführt wird. Vergleicht man die Absorptionsmaxima der einzelnen Biliproteide (Abb. 24), so wird sofort deutlich, daß die Aufspaltung des C-Phycoerythrins in kürzer- und längerwellig absorbierende Chromophore zu einer Reduzierung der Energielücke führt. Das wiederum bedeutet, daß dadurch die Transferwahrscheinlichkeit erhöht wird. Andererseits wird ein Rücktransfer nur mit sehr geringer Wahrscheinlichkeit stattfinden, so daß eine ausgedehnte Excitonenpopulation innerhalb einer Farbstoffschicht, wodurch die direkte Energieleitung zum Chlorophyll verzögert würde, sehr unwahrscheinlich wird. Somit bilden die in den Phycobilisomen lokalisierten Biliproteide einen idealen Trichter, durch den die Anregungsenergie zum Chlorophyll transferiert werden kann.

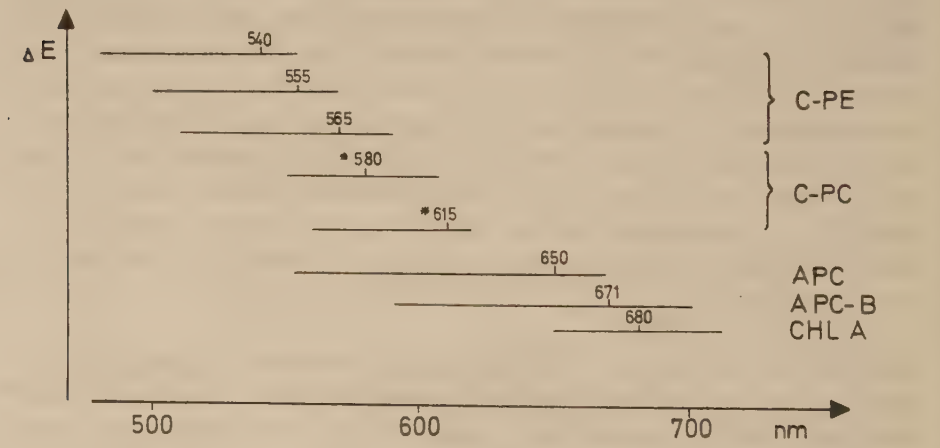

Abb. 24: Energieschema der Biliproteide in Phycobilisomen

* Diese Werte entsprechen der Aufspaltung im Absorptionsspektrum des C-Phycocyanins bei -196°C (Scheer, Kufer 1977).

4. Untersuchungen zur Proteindenaturierung im C-Phycoerythrin

4.1. Proteinfaltung und -entfaltung

Die Ausbildung der dreidimensionalen Struktur eines Proteinmoleküls (= Proteinfaltung) ist ausschließlich in der Primärsequenz begründet. Sie verläuft in vitro unter entsprechenden Bedingungen (pH-Wert, Ionenstärke, Temperatur) spontan. Der native Zustand entspricht in einer gegebenen Umgebung der thermodynamisch stabilsten Konformation (Haber, Anfinsen 1962; Lapanje 1976). Die Proteinfaltung verläuft sehr schnell (einige Sekunden bis Minuten), und bis jetzt ist nicht endgültig geklärt, inwieweit der Prozeß thermodynamisch oder kinetisch kontrolliert wird (Yon 1978; Baldwin 1975). Es wird heute ein Mechanismus diskutiert, der über die Ausbildung definierter Zwischenstufen verläuft (Yon 1978; Tanaka, Scheraga 1975).

Bei der Denaturierung geht die Raumstruktur durch Lösung aller nicht-kovalenten Bindungen verloren, während die kovalenten Bindungen erhalten bleiben. Die Proteinkette entfaltet sich und geht in eine gestrecktere Kette über, wobei Nebenvalenzen sich zufällig ausbilden ("random coil"). Durch die Denaturierung kommen somit auch Gruppen an die Oberfläche, die vorher im Molekül verborgen waren und jetzt reaktionsfähig sind. Insgesamt entspricht die Denaturierung einem Übergang von einem geordneten in einen ungeordneten Zustand und ist somit dem Schmelzvorgang von Kristallen vergleichbar (Lapanje 1976).

Bei der Bildung oligomerer Proteine wurden bisher zwei verschiedene Mechanismen gefunden (Yon 1978). Im ersteren Fall verläuft die Ausbildung der Tertiärstruktur der Untereinheiten nur bis zu einer inaktiven Vorstufe. Die "biologische Aktivität" wird erst durch die Aggregation zum oligomeren Protein erreicht. Im zweiten Fall sind bereits die Untereinheiten "aktiv" (Chan 1972).

Wenn man die unmittelbare Umgebung der PEB-Chromophore als aktives Zentrum definiert, so liegt in dem hier untersuchten C-Phycoerythrin offensichtlich der zweite Mechanismus vor, da wie in Abschnitt 2.5.2. ausgeführt wurde, die Chromophorkonformation bereits durch die Rückfaltung der Untereinheiten festgelegt wird.

Die Untersuchungen zur Proteindenaturierung beim C-Phycoerythrin wurden durchgeführt, um folgende Fragen zu klären:

1. Werden 's'- und 'f'-Chromophore gleichermaßen bei Proteinentfaltungsreaktionen in ihrer Konformation verändert oder werden die einen früher als die anderen angegriffen?

2. Gibt es Hinweise auf metastabile Zwischenstufen, bei denen noch eine Tertiärstruktur vorhanden ist, welche aber nicht mehr dem "nativen" Zustand entspricht?

"Nativ"bezieht sich im folgenden auf isoliertes, gereinigtes C-Phycoerythrin bei Raumtemperatur und bei neutralem pH-Wert.

4.2. Proteindenaturierung durch pH-Änderung

Wird das Protein in eine Umgebung gebracht, deren pH-Wert weit entfernt vom isoelektrischen Punkt liegt, so erfolgt ein immer stärkerer Ladungsausgleich der Aminosäuren. Aufgrund elektrostatischer Wechselwirkung zwischen den geladenen Gruppen erfolgt Abstoßung, welche zu einer partiellen oder auch vollständigen Proteindenaturierung führt. Dabei hängt die Stabilität der nativen Konformation sehr stark von den individuellen Proteinen ab. Während einige Proteine noch im stark sauren stabil sind, sind andere unempfindlich gegen Alkali (Lapanje 1976).

Innerhalb bestimmter pH-Bereiche besitzen Proteine eine gewisse Pufferkapazität, der auch eine physiologische Bedeutung zukommt.

4.2.1. Absorption

C-Phycoerythrin bleibt zwischen pH 6,0 und pH 8,0 in der Absorption konstant. Im sauren erfolgt bis pH 5,0, im alkalischen bis pH 9,0 nur eine sehr geringe Abnahme im Maximum, die sich bis pH 4,0 und entsprechend pH 10,0 deutlich verstärkt (Abb. 26). Bei pH 10,0 tritt eine Schulter zwischen 585-600 nm auf und eine leichte Extinktionszunahme zwischen 470 und 510 nm (Abb. 25). Während im alkalischen Bereich nur eine sehr geringe Verschiebung im Maximum auftritt (bis pH 10,0 nur 3 nm), wird bei pH 4,0 eine Schulter bei 540 nm sichtbar, entsprechend dem Absorptionsspektrum in 6 M Harnstoff (Abb. 32). Zwischen pH 10,0 und pH 10,6 erfolgt eine drastische Umwandlung im Absorptionsspektrum (Abb.25).

Um diese Spektraländerungen interpretieren zu können, muß man sie zunächst mit den Spektraldaten des Phycoerythrobilins ohne Proteineinfluß vergleichen. In Tabelle 8 sind die Absorptionsmaxima von Säure, Anion und Zinkkomplex von denaturiertem C-Phycoerythrin angegeben.

Tabelle 8: Absorptionsmaxima des denaturierten C-Phycoerythrins und des Mesobilirhodins IX

Pigment	pH 3,0 λ_{max}	pH 7,0-pH 10 λ_{max}	pH 13,3 λ_{max}	pH 7,8 + Zn^{++} λ_{max}
C-Phycoerythrin[a] (denaturiert)	555 nm (590 nm)	515-540 nm	590 nm[b*] (540 nm)	586 nm (550 nm)
	2 % HCl λ_{max}	1 % NH_3 λ_{max}	Anion λ_{max}	0,2 % Zn/1 % NH_3 λ_{max}
Mesobilirhodin[c] IX (Phycoerythrin Modell)	564 nm	488 nm	582 nm[d]	586 nm

Die in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen Schultern im Absorptionsspektrum

*Für die Überlassung der Daten sei Frau I.Blos herzlich gedankt.

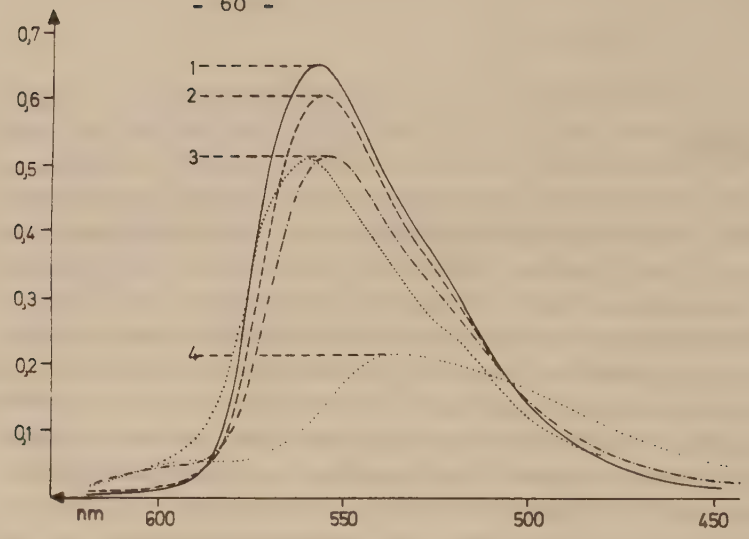

Abb. 25: Absorptionsspektren des C-Phycoerythrins bei der alkalischen Proteindenaturierung 1) bei pH 7,0 2) bei pH 9,6 3) bei pH 10,0 4) bei pH 10,6. Die gepunktete Linie bei 3 zeigt das Fluoreszenzerregerspektrum bei pH 10,0 (Beobachtungswellenlänge bei 590 nm).

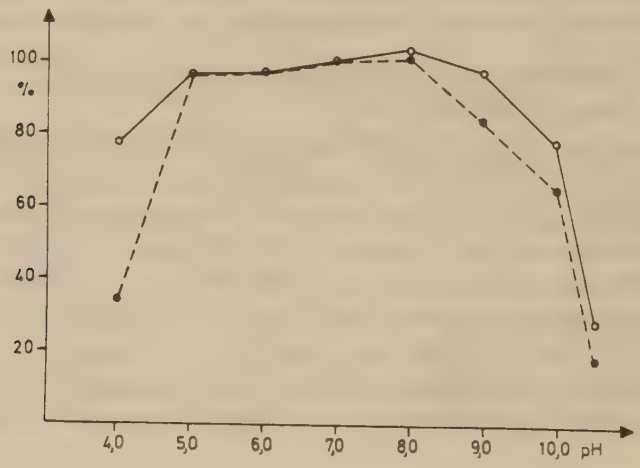

Abb. 26: Abnahme der langwelligen Absorptionsbande des C-Phycoerythrins bei 558 nm (-o-o-o-) sowie Änderungen der relativen Fluoreszenzquantenausbeuten (-●--●--●-) als Funktion des pH-Wertes. Als Bezugsgröße wurde die Extinktion bzw. die Fluoreszenzquantenausbeute bei pH 7,0 gewählt (100 % Wert). Die Fluoreszenzquantenausbeuten wurden auf gleiche Extinktion bei der Anregungswellenlänge (bei 535 nm) korrigiert.

a) in 8 M Harnstoff
b) in 8 M Harnstoff und ohne Harnstoff
c) in Methanol mit 4 M Guanidiniumchlorid (Köst 1974)
d) Köst, Rüdiger 1977

Da der pK-Wert des Übergangs Säure-Base vom Mesobilirhodin und vom Phycoerythrin-Chromophor bei pH 7,6 $\pm$ 0,1 liegt (Köst, Rüdiger 1977), liegt über $\sim$ pH 7,0 vorwiegend die basische Form vor. Das breite unspezifische Absorptionsmaximum des denaturierten C-Phycoerythrins variiert zwischen 515 und 540 nm (abhängig vom Lösungsmittel). Die basische Form des Mesobilirhodin IXα (Abb. 27), das hier als Vergleichsgallenfarbstoff herangezogen werden kann (Köst 1974), absorbiert bei 488 nm (Tab. 8). Daraus folgt, daß ohne Proteineinfluß zwischen pH 7,6 und pH 13,0 ein Gleichgewicht zwischen der basischen Form und dem Anion des Chromophors vorliegt. Da der pK-Wert des Übergangs Base-Anion über pH 13,0 liegt (Köst, Rüdiger 1977), sind die beobachteten Spektraländerungen bis pH 10,6 im nativen C-Phycoerythrin nicht allein auf die Bildung des Anions zurückzuführen.
Unter denaturierenden Bedingungen bildet sich ab pH 7,0 immer eine kleine Schulter bei 590 nm. Diese beruht wahrscheinlich auf der Bildung des Zinkkomplexes, der sich bereits mit geringen Spuren von Zink ausbildet, die als Verunreinigung im Puffer vorliegen können. Man kann hier allerdings nicht vom Anion unterscheiden, da die Absorptionsspektren sehr ähnlich sind.

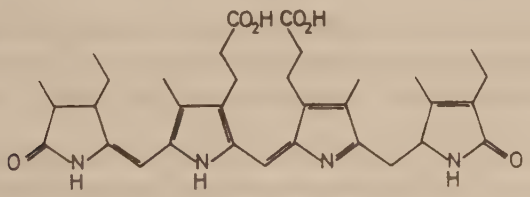

Abb. 27: Mesobilirhodin IXα

Abb. 25 zeigt deutlich, daß zwischen pH 10,0 und pH 10,6 eine Proteindenaturierung stattfindet, verbunden mit einer Konformationsänderung der Chromophore. Da eine Abnahme der Absorption nicht bevorzugt im lang- oder kurzwelligen Spektralbereich verläuft, sind sowohl 's'- wie 'f'-Chromophore betroffen.

Im sauren pH-Bereich bleibt C-Phycoerythrin bis pH 5,0, also bis etwa zum isoelektrischen Punkt (pI. = 4,85) stabil.

4.2.2. Sedimentationskonstanten

Nach Abb. 28 findet eine Abnahme der Sedimentationskonstanten von 5,5 auf 2,2 zwischen pH 9,0 und pH 10,6 statt. Einen Sedimentationskoeffizienten von 2,2 für C-Phycoerythrin aus Tolypothrix tenuis bestimmten Hattori und Fujita (1959) bei pH 11,6. Dieser Wert liegt etwas niedriger als die Sedimentationskonstanten der monomeren Untereinheiten (vgl. Tab. 7). Ab pH 9,0 bis pH 10,6 findet beim C-Phycoerythrin ein Dissoziationsprozeß und eine Proteinentfaltung statt. Aufgrund des einheitlichen Verlaufs der Kurve (Abb. 28) kann man zwischen diesen beiden Prozessen

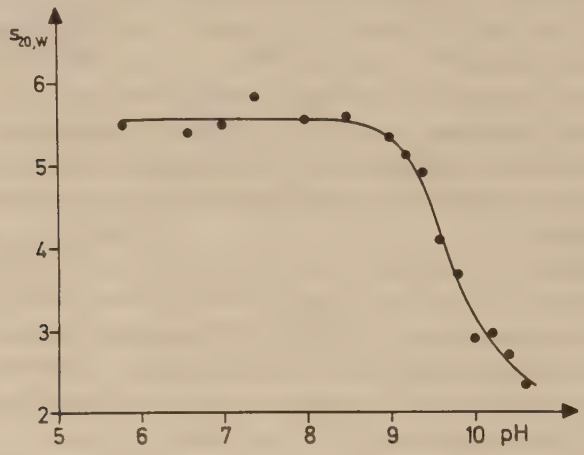

Abb. 28: Sedimentationskoeffizienten des C-Phycoerythrins als Funktion des pH-Wertes. Die Bestimmungen wurden bei einer Proteinkonzentration 0,4 bis 0,5 mg/ml bei konstanter Ionenstärke (I = 0,1) durchgeführt.

nicht unterscheiden. Die Absorptionsänderungen weisen dagegen darauf hin, daß bis pH 10,0 eine Proteindenaturierung nur in sehr geringem Ausmaß stattfindet, d.h. die Abnahme der S-Werte ist innerhalb dieses pH-Bereiches im wesentlichen auf den Dissoziationsprozeß zurückzuführen. Dagegen erfolgt spontane Proteinentfaltung zwischen pH 10,0 und pH 10,6.
Für B-Phycoerythrin aus Porphyridium cruentum fanden Fujimori und Pecci (1970) einen konstanten S-Wert bis pH 10,4. Auch die Absorption ist bis pH 10,0 unverändert.

Die Daten über R-Phycoerythrin sind widersprüchlich. Eine Abnahme der Sedimentationskonstanten ab pH 10,5 bis auf einen Wert von 2 wurde von Eriksson-Quensel (1938) gefunden. Erokhina und Krasnovski (1968) fanden bereits bei pH 10,0 eine Abnahme der Absorption bis auf etwa die Hälfte des Ausgangswertes und eine deutliche Schulter um 600 nm, was auf eine Proteinentfaltung hinweist. Im Gegensatz dazu fanden Svedberg und Katsurai (1929) bei pH 11,0 noch 75 % R-Phycoerythrin mit einem MG von 208 000. Diese unterschiedlichen Daten basieren wahrscheinlich darauf, daß R-Phycoerythrin aus verschiedenen Organismen untersucht wurde sowie auf unterschiedlichen Isolierungs- und Untersuchungsbedingungen. Zusammenfassend kann man sagen, daß bei allen drei Phycoerythrinen eine Proteinentfaltung zwischen pH 10 und pH 11 stattfindet.

4.2.3. Fluoreszenz

Die Änderungen der relativen Fluoreszenzintensitäten verlaufen wie die Absorptionsänderungen (Abb. 26). Allerdings ist die Fluoreszenzabnahme ausgeprägter. Im Gegensatz zur Absorption ist die Fluoreszenzquantenausbeute ein empfindlicheres Indiz auf Umgebungsänderungen (Lapanje 1976). Im pH-Bereich von 5-8 ändert sich weder die Intensität merklich noch die Form der Emissionsbande. Ab pH 9,0 wird die Schulter zwischen 600 und 640 nm (Abb. 29 a) deutlicher und tritt bei pH 10,6 als zweites Maximum in Erscheinung.

Dieses Nebenmaximum ist entweder auf eine Konformationsänderung der fluoreszierenden Chromophore zurückzuführen oder auf eine zweite fluoreszierende Komponente.

Das Erregerspektrum bei pH 10,0 (Abb. 29 b) zeigt deutlich, daß die Fluoreszenzemission bei 590 nm nach Anregung aller nativen Chromophore erfolgt, d.h. das Erregerspektrum entspricht im wesentlichen dem Absorptionsspektrum des C-Phycoerythrins (vgl. auch Abb. 25). Somit sind hier noch native 'f'- und 's'-Chromophore vorhanden und es findet ein Energietransfer zwischen diesen statt. Im kurzwelligen Spektralbereich ist die Überlappung weniger gut erfüllt. Ein Teil der kurzwellig absorbierenden Chromophore ist somit nicht mehr an der Fluoreszenz beteiligt.

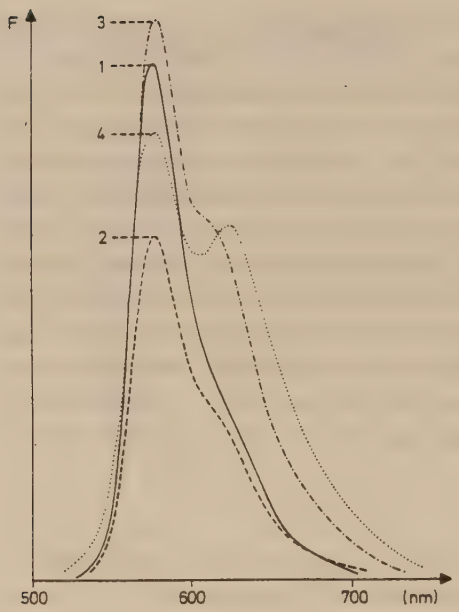

Abb. 29 a: Fluoreszenzemissionsspektren des C-Phycoerythrins bei der alkalischen Proteindenaturierung. 1) Bei pH 7,0; 2) bei pH 9,6; 3) bei pH 10,0 (um den Faktor 3 verstärkt); 4) bei pH 10,6 (um den Faktor 10 verstärkt). Die Fluoreszenz wurde bei 535 nm angeregt.

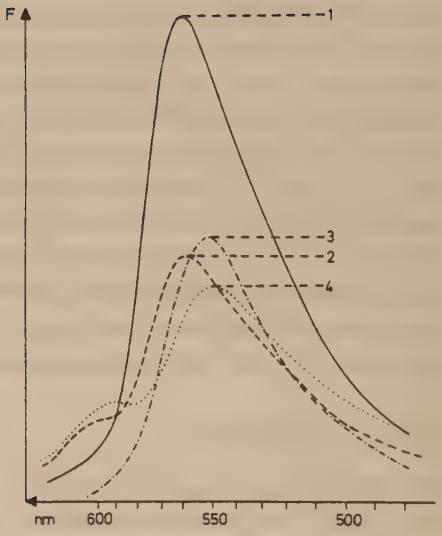

Abb.29 b: Fluoreszenzerregerspektren des C-Phycoerythrins bei der alkalischen Proteindenaturierung 1) bei pH 10,0, Beobachtungswellenlänge 590 nm: 2) bei pH 10,0, Beobachtungswellenlänge bei 640 nm; 3) bei pH 10,6, Beobachtungswellenlänge bei 590 nm; 4) bei pH 10,6,Beobachtungswellenlänge bei 640 nm.

Beobachtet man dagegen die langwellige Flanke (Abb. 29 b), so erfolgt hier zusätzlich eine Emission nach Anregung zwischen 580 und 610 nm. Demnach ist das Nebenmaximum eine Fluoreszenz dieser zweiten Komponente, die entweder dem Zinkkomplex oder dem Anion entspricht.

Bei pH 10,6 ist das Erregerspektrum gegenüber dem Absorptionsspektrum deutlich bathochrom auf 550 nm verschoben. Daraus folgt, daß das Absorptionsspektrum bei pH 10,6 aus verschiedenen Komponenten besteht, von denen im wesentlichen nur die langwellig absorbierenden Chromophore fluoreszieren. Aus der Lage und Form der Fluoreszenzspektren (Abb. 29 a, b) muß man annehmen, daß noch 'f'-Chromophore im nativen Zustand vorhanden sind. Diese Aussage wird auch durch die Fluoreszenzquantenausbeute gestützt, die immerhin noch etwa 20 % des Ausgangswertes beträgt. Da aber das Maximum des Erregerspektrums bei 550 nm liegt, zeigt das Erregerspektrum, daß hier außer 'f'-Chromophoren noch weitere Komponenten an der Fluoreszenzemission beteiligt sind. Inwieweit hier außer dem Zinkkomplex bzw. dem Anion (siehe Schulter um 600 nm im Erregerspektrum) weitere Komponenten (z.B. 's'-Chromophore oder veränderte 's'- oder 'f'-Chromophore) beteiligt sind und somit noch ein Energietransfer möglich ist, darüber kann man keine Aussagen treffen, da sich die Absorptionsspektren stark überlappen.

Die Reversibilität der alkalischen Proteindenaturierung wurde an einer bei pH 10,2 denaturierten C-Phycoerythrin-Lösung untersucht. Nach Gelfiltration an Biogel-P_2 wurden $\sim$ 80 % C-Phycoerythrin wiedergefunden. Das Absorptionsspektrum entsprach dem nativen C-Phycoerythrin-Spektrum, die langwellige Schulter um 590 nm fehlte. Die Renaturierung nach Alkali-Behandlung verläuft somit voll reversibel bezogen auf die Absorption, da auch bei einer Vergleichslösung nur $\sim$ 80 % des Ausgangswertes nach Gelfiltration wiedergefunden wurden.

4.3. Denaturierung mit Harnstoff

Die denaturierende Wirkung des Harnstoffs auf globuläre Proteine beruht im wesentlichen auf der Bindung des Harnstoffs an das Protein. Da Harnstoff ähnlich wie Wasser H-Brückenbindungen ausbilden kann, tritt er mit den polaren Gruppen im Protein in Wechselwirkung und verdrängt die Wasser-Moleküle. Je stärker die Proteinkette entfaltet wird, um so mehr Bindungsstellen werden den Harnstoffmolekülen zugänglich. In 8-9 M Harnstofflösungen

liegen die meisten Proteine vollständig entfaltet vor ("random coil"). Bei Anwesenheit von Disulfidbrücken muß zusätzlich ein Reduktionsmittel vorhanden sein. In diesem Fall kommt auf 3 Aminosäure-Reste ein gebundenes Harnstoffmolekül (Lapanje 1976).

4.3.1. Absorption

Bis zu einer Harnstoffkonzentration von 3 M ändert sich das Absorptionsspektrum bis auf eine geringe Abnahme im Maximum nicht gegenüber dem nativen C-Phycoerythrin-Spektrum. Erst ab 4 M Harnstoff wird die langwellige Absorptionsbande etwas breiter (Zunahme bei 520 nm, Abnahme 560 nm). Mit zunehmender Harnstoffkonzentration werden diese Änderungen drastischer, bis in 8 M Harnstoff ein breites Spektrum mit Maximum zwischen 520 und 540 nm vorliegt. Die Extinktion im Maximum ist auf ca. 1/3 der Ausgangslösung zurückgegangen. Trägt man die Extinktionsänderungen als Funktion der Harnstoffkonzentrationen auf (Abb. 30), so ähneln die Kurven "Titrationskurven", wobei der Wendepunkt zwischen einer 5 und 6 M-Harnstoffkonzentration liegt.

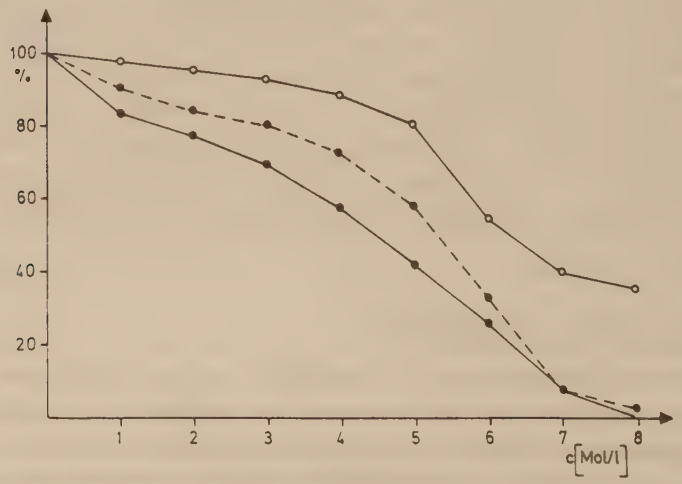

Abb. 30: Abnahme der langwelligen Absorptionsbanden des C-Phycoerythrins und der relativen Fluoreszenzquantenausbeuten als Funktion der Harnstoffkonzentration bei pH 7,0. -o-o-o- Extinktionsabnahme bei 558 nm, Messung 90 Minuten nach erfolgter Harnstoffinkubation; --●--●-- relative Fluoreszenzquantenausbeute, Messung 5 Minuten nach erfolgter Harnstoffinkubation, —●—●— relative Fluoreszenzquantenausbeute, Messung 90 Minuten nach erfolgter Harnstoffinkubation. Die Fluoreszenzquantenausbeuten wurden auf gleiche Extinktion bei der Anregungswellenlänge (bei 535 nm) korrigiert.

Die Absorption bei 280 nm (Proteinpeak) variiert und ist schlecht reproduzierbar, so daß diese Werte nicht zu interpretieren sind. Insgesamt werden die Chromophore während des Denaturierungsprozesses in eine kurzwellig absorbierende Form umgewandelt. Dabei tritt eine merkliche Proteindenaturierung erst ab einer 4 M Harnstoffkonzentration auf.

R-Phycoerythrin aus Callithamnion rubosum (Erokhina, Krasnovski 1968) ist dagegen stabiler, da eine starke Absorptionsabnahme erst in 6 M Harnstoff stattfindet. Die Harnstoffdenaturierung beim C-Phycocyanin aus Phormidium luridum (Chen et al. 1977) verläuft sehr ähnlich wie beim C-Phycoerythrin, C-Phycocyanin aus Spirulina platensis (Scheer, Kufer 1977) zeigt dagegen eine stufenweise Denaturierung (konstante Absorption zwischen 4 und 5 M Harnstoff).

In Abbildung 31 sind die Absorptionsspektren des C-Phycoerythrins nativ und in 8 M Harnstoff bei pH 7,0 und pH 3,0 dargestellt. Die Oszillatorstärke ist zurückgegangen, Lage und Form der Absorptionsbanden sind verändert.

Tabelle 9: Extinktionsverhältnisse des C-Phycoerythrins: sichtbare Bande: UV-Bande sowie denaturiert: nativ

C-Phycoerythrin	λ_{max} [nm] sichtbare Bande	λ_{max} [nm] UV-Bande	$\frac{E\ UV\text{-}Bande}{E\ sichtbare\ Bande}$
nativ, pH 7,0	558	305	1 : 6,68
pH 7,0: denat.*	525-540	305	1 : 1,25
pH 3,0; denat.*	555	305	1 : 1,99
	$\frac{E\ denat.}{E\ nativ}$	$\frac{E\ denat.}{E\ nativ}$	
pH 7,0	1 : 3,21	1,66 : 1	
pH 3,0	1 : 1,82	1,84 : 1	

* in 8 M Harnstoff

Tabelle 10: Einfluß von Struktur- und Konformationsänderungen auf die Spektraleigenschaften bei Modellchromophoren

Struktur- u. Konformationsänd.	Spektraländerungen	Literatur
Geometrie: Übergang gestreckt-cyclisch	Abnahme der Oszillatorstärke in der sichtbaren Bande und Anstieg der UV-Bande	Burke et al. 1975 Chae et al. 1975 Falk et al. 1977 b Choussy, Barbier 1975 Bois-Choussy, Barbier 1977, 1978 Sugimoto et al. 1977 Wagnière, Blauer 1976
Isomerisierung: Übergang syn-Z,Z,Z zu E,Z,Z	hypsochrome Verschiebung der sichtbaren Bande um etwa 40 nm	Falk, Grubmayer 1977 c Falk et al. 1979
Abweichungen von der planaren Struktur: Verdrillung um C 15, 16 Doppelbindung	hypsochrome Verschiebung der sichtbaren Bande, je nach Verdrillungsgrad	Sheldrick et al. 1978 Bonfiglio et al. 1977
Tautomerie: Einschränkung des Protonentransfers zwischen den N-Atomen an Ring B und C	Fluoreszenzanstieg	Scheer 1978 Falk et al. 1977 a
Protonierung	bathochrome Verschiebung der sichtbaren Bande	Köst et al. 1975 Scheer, Kufer 1977 Scheer 1976

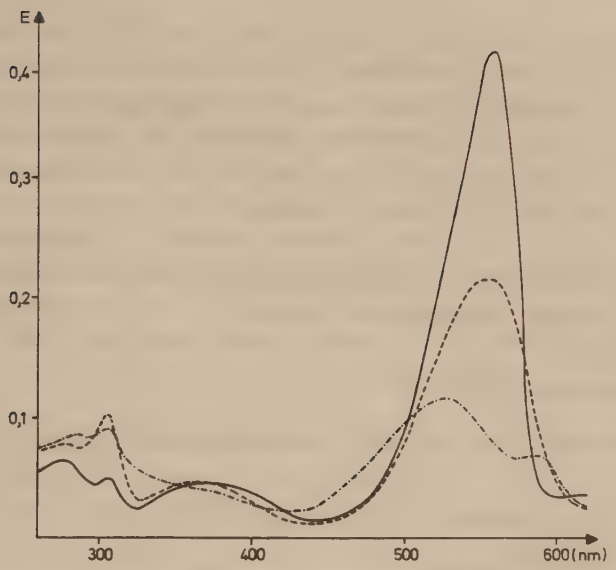

Abb. 31: Absorptionsspektren des C-Phycoerythrins in 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0 (———); in 8 M Harnstoff pH 3,0 (------); in 8 M Harnstoff in 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0 (-.-.-.-.-).

In Tabelle 9 sind diese Änderungen zusammengestellt. In Tabelle 10 ist eine Übersicht über den Zusammenhang zwischen Konformations- und Strukturänderungen und Spektraldaten von Modellchromophoren gegeben.

Die meisten der hier angeführten Untersuchungen sind allerdings an Bilatrienen(Phycocyanin-ähnlichen Chromophoren) durchgeführt worden, so daß man für C-Phycoerythrin nur Analogieschlüsse ziehen kann.

Die beobachteten Spektraländerungen beim Übergang nativ zu denaturiert weisen auf Geometrieänderungen von einer gestreckten in eine cyclische Konformation hin, da die Oszillatorstärke der sichtbaren Bande abnimmt, während die UV-Bande zunimmt. Ein entsprechendes Verhalten wurde auch beim C-Phycocyanin beobachtet

und analog interpretiert (Scheer, Kufer 1977). Die hypsochrome Verschiebung kann auf einem stärkeren Verdrillungsgrad der cyclischen Konformation beruhen. Da die beiden endständigen Sauerstoff-Atome sich in der cyclischen Konformation überlappen, können die 4 Pyrrolringe nicht in einer Ebene liegen, sondern müssen zwangsläufig eine helicale Struktur einnehmen.

Die bathochrome Verschiebung bei Protonierung stimmt mit den Beobachtungen bei Modellchromophoren überein.

4.3.2. Sedimentationskonstanten

Tabelle 11: Sedimentationskonstanten vom C-Phycoerythrin in 4 M Harnstoff

	Proteinkonzentration mg/ml	$s_{20^\circ,w}$
C-PE	0,440	$2,4 \times 10^{-13}$
C-PE	0,098	$2,2 \times 10^{-13}$

Lösungsmittel: 4 M Harnstoff in Tris-HCl Puffer pH 7,0, Ionenstärke 0,1.

Die Sedimentationskoeffizienten in 4 M Harnstoff (siehe Tab.11) entsprechen den S-Werten der Untereinheiten (vgl. Tab. 7). Demnach scheint bereits eine 4 M Harnstofflösung zur Dissoziation auszureichen. Auch bei einem höheren Anteil an dimeren Molekülen (siehe Proteinkonzentration 0,440 mg/ml) erfolgt Dissoziation.

Entsprechende Ergebnisse fanden Chen et al. (1977) bei der Harnstoffdenaturierung von C-Phycocyanin. Bei der Sedimentationsgleichgewichtsanalyse bestimmten sie in 4 M Harnstoff Molekulargewichte, die den Untereinheiten entsprachen, während in 3 M Harnstoff ein Gemisch aus monomerem Phycocyanin und Untereinheiten vorlag.

4.3.3. Fluoreszenz

Trägt man die relativen Fluoreszenzquantenausbeuten gegen die Harnstoffkonzentrationen auf, so verläuft die Fluoreszenzabnahme nahezu parallel zur Absorptionsabnahme (Abb. 30). Die Abnahme ist jedoch wesentlich ausgeprägter. 90 Minuten nach Inkubation des C-Phycoerythrins in 8 M Harnstoff ließ sich keine Fluoreszenz mehr nachweisen. Dagegen fanden Erokhina und Krasnovski (1968) bei einem R-Phycoerythrin noch 40 % Fluoreszenz in 8 M Harnstoff (Messung nach 1 h).
Der Verlauf der Fluoreszenzabnahme beim C-Phycoerythrin entspricht ebenso wie die Absorption einem $N \rightleftharpoons N' \rightleftharpoons D$ Übergang.

N = natives C-Phycoerythrin
N' = nicht assoziierte Untereinheiten
D = denaturiertes C-Phycoerythrin ("random coil"), reversibel (siehe später)

Bis 3-4 M Harnstoff beruhen die Absorptions- und Fluoreszenzänderungen im wesentlichen auf dem Dissoziationsprozeß. Ähnliche Ergebnisse fanden Chen et al. (1977) beim C-Phycocyanin (CD-Spektren).

Beim C-Phycoerythrin wird diese Aussage durch die Lage und Form der Fluoreszenzemissions- und Erregerspektren bestätigt (Abb. 32). Bis 4 M Harnstoff sind Absorptions- und Erregerspektren deckungsgleich, die Fluoreszenzemissionsbande entspricht in Lage und Form nativem C-Phycoerythrin.

In 6 M Harnstoff unterscheiden sich Absorptions- und Erregerspektren dagegen deutlich voneinander, während die Emissionsbande unverändert ist (Abb. 32). Das Erregerspektrum ist bis auf eine geringe langwellige Verschiebung im Maximum (565 nm) nahezu identisch mit dem Spektrum von C-Phycoerythrin. Es "filtert" die noch vorhandenen "nativen" Moleküle heraus. "Nativ" muß hier auf die Chromophorbereiche eingeschränkt werden, da wir nur diese beobachteten. Ein Teil der kurzwellig absorbierenden Chromophore ist also nicht mehr am Energietransfer bzw. an der Fluoreszenz beteiligt, sondern entkoppelt.

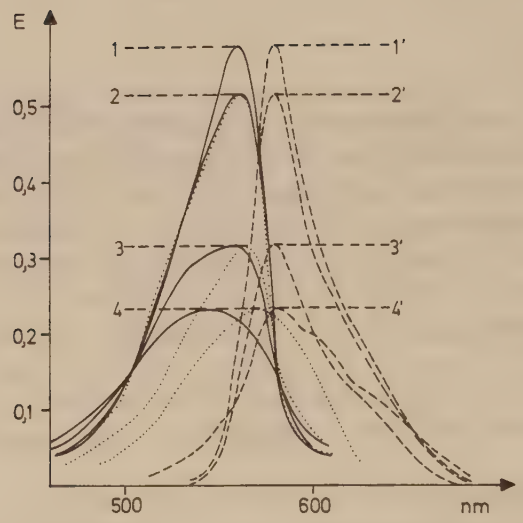

Abb. 32: Absorptions-, Fluoreszenzemissions- und -erregerspektren des C-Phycoerythrins bei verschiedenen Harnstoffkonzentrationen bei pH 7,0. Die Fluoreszenzspektren wurden auf die Absorptionsspektren normiert. ——— Absorptionsspektren, ... Fluoreszenzerregerspektren, ------ Fluoreszenzemissionsspektren. 1,1' in Tris-Puffer I = 0,1; 2,2' in 4 M Harnstoff; 3,3' in 6 M Harnstoff; 4,4' in 7 M Harnstoff. Beobachtungswellenlänge 640 nm, Anregungswellenlänge 535 nm.

In 7 M Harnstoff weist das Fluoreszenzemissionsspektrum dagegen eine deutliche Schulter bei 600-610 nm sowie eine Fluoreszenz zwischen 520-560 nm auf. Hier sind mehrere Komponenten an der Fluoreszenzemission beteiligt.

Das Erregerspektrum (Beobachtung bei 640 nm) ist deutlich bathochrom verschoben (Schulter bei 595 nm). Sowohl aus dem Erreger- wie auch aus dem Emissionsspektrum geht hervor, daß hier als zweite Komponente wahrscheinlich der Zinkkomplex fluoresziert.(Vergleiche dazu Absorptions- und Fluoreszenzemissionsspektrum des Zinkkomplexes in 8 M Harnstoff, Abb. 33).

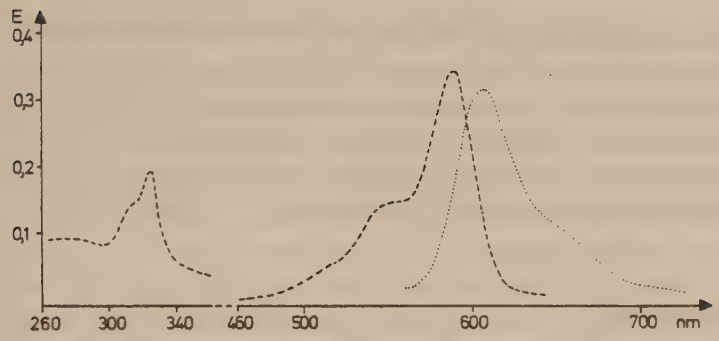

Abb. 33: Absorptions- und Fluoreszenzemissionsspektrum vom Zinkkomplex des C-Phycoerythrins in 8 M Harnstoff bei pH 7,8. ------ Absorptionsspektrum, ... Emissionsspektrum. (Anregungswellenlänge bei 535 nm).

Die im kurzwelligen Spektralbereich auftretende Fluoreszenz von 's'-Chromophoren zeigt deutlich, daß hier der Energietransfer zum Teil entkoppelt ist. Ähnliche Ergebnisse fanden Macdowall et al. (1968) beim R-Phycoerythrin in 8 M Harnstoff.

In 7 M Harnstoff sind beim C-Phycoerythrin verschiedene Chromophore in der Lösung vorhanden:
(1) kurzwellig absorbierende, weder sensitizierende noch fluoreszierende Chromophore
(2) wahrscheinlich als Zinkkomplex vorliegende Chromophore
(3) fluoreszierende und sensitizierende 's'-Chromophore
(4) 'f'-Chromophore.

(1) und (2) entspricht Chromophoren bei vollständig entfalteter Proteinkette, während das Vorhandensein von (3) und (4) auf eine noch vorhandene Tertiärstruktur zumindest in einigen Proteinabschnitten hinweist.

Die Entkopplung des Energietransfers zeigt, daß eine räumliche Trennung oder eine Umorientierung von 's'- und 'f'-Chromophoren stattfindet. Die Tatsache, daß 's'-Fluoreszenz auftritt, zeigt, daß zumindest kurzfristig nach der Entkopplung bzw. Umorientierung die Tertiärstruktur, die für die native Konformation der

's'-Chromophore notwendig ist, in diesem Proteinabschnitt noch erhalten ist. Diese Daten deuten auf eine stufenweise Proteinentfaltungsreaktion hin. Diese Aussagen müssen jedoch durch weitere Untersuchungen gestützt werden. Eine genaue Separierung der verschiedenen in Lösung vorliegenden Chromophore ist im C-Phycoerythrin wegen der starken Überlappung der Absorptionen schwierig.

4.3.4. Renaturierung

Die Renaturierung einer in 8 M Harnstoff (pH 3,0 und pH 7,0) denaturierten C-Phycoerythrin-Lösung wurde durch Dialyse oder durch Gelfiltration über Biogel-P_2 durchgeführt. Bezogen auf die Absorption erfolgt eine nahezu vollständige Renaturierung (vgl. Abschnitt 4.2.3.). Das renaturierte Produkt wurde nach folgenden Reinheitskriterien untersucht: Spezifischer Extinktionskoeffizient, Absorptionsverhältnis $\frac{E\ 560\ nm}{E\ 280\ nm}$, SDS-Gelelektrophorese, isoelektrischer Punkt und Fluoreszenzquantenausbeuten. Der spezifische Extinktionskoeffizient war auf 40-50 abgesunken (vgl. Tab. 2), der Reinheitsgrad ($\frac{E\ 560\ nm}{E\ 280\ nm}$) auf Werte zwischen 3,1 und 4, in der SDS-Elektrophorese waren dagegen weder höhere Aggregate noch Banden niederen Molekulargewichts aufgetaucht. Das Chromophorverhältnis (vgl. dazu Abschnitt 2.3.2.) lag bei der Renaturierung über Biogel-P_2 zwischen 1:1,45 und 1:1,55, bei der Dialyse war es dagegen auf ein 1:1-Verhältnis abgesunken. Am empfindlichsten erwies sich die Bestimmung der isoelektrischen Punkte sowie die Fluoreszenzquantenausbeute. Vollständig renaturiertes C-Phycoerythrin konnte am Auftauchen der beiden typischen Banden bei pI. 4,75 (Nebenzone) und pI. 4,85 (Hauptzone) identifiziert werden. Dagegen zeigten Verunreinigungen durch unvollständige Renaturierung basischere isoelektrische Punkte zum Teil bis pH 5,9. Die Fluoreszenzquantenausbeuten von renaturiertem C-Phycoerythrin (Tab. 4) sind gegenüber dem nativen verringert. "Falsche" Assoziation von α- und ß-Untereinheit verringern somit die Fluoreszenzfähigkeit des C-Phycoerythrins. Eine Renaturierung von ca. 77 % fanden Murphy und O'Carra (1970) für C-Phycocyanin (Denaturierung in 8 M Harnstoff).

4.4. Proteindenaturierung durch Temperaturerhöhung

Die Proteindenaturierung durch Temperaturerhöhung beruht auf einer Aufspaltung von H-Brückenbindungen und auf einer Änderung van der Waal'scher Wechselwirkungen im Molekül. Da Wassermoleküle mit steigender Temperatur die Fähigkeit verlieren, Assoziate durch H-Brücken zu bilden, nimmt die Hydratation der polaren Gruppen ab. Es kommt außerdem zu verstärkten Wechselwirkungen zwischen unpolaren Gruppen und Wassermolekülen, wodurch die Stabilität des Proteinmoleküls negativ beeinflußt wird (Lapanje 1976). Einige Untersuchungen weisen darauf hin, daß bei der Hitzedenaturierung die Sekundärstruktur in einigen Regionen erhalten bleibt (Baldwin 1975). Nach Jaenicke (1971) beruht die Koagulation bei höherer Temperatur auf einer Polimerisation entweder noch vollkommen nativer Moleküle oder von Molekülen, deren Sekundärstruktur noch erhalten ist.

4.4.1. Absorption

In Abbildung 34 sind die sichtbaren Absorptionsbanden bei Temperaturen zwischen 10° und 70°C dargestellt. Man erkennt deutlich eine Abnahme der Oszillatorstärke bei Temperaturerhöhung (die Fläche des 60°-Spektrums ist gegenüber dem 10°-Spektrum verringert) sowie eine hypsochrome Verschiebung des Maximums von 558 nm auf 550 nm. Die unsymmetrische Form der Bande bleibt aber erhalten. Das 70°-Spektrum zeigt dagegen einen breiten, fast symmetrischen Peak mit Maximum bei 520 nm und einer Schulter bei 590 nm. Die Absorptionsänderung am Maximum (bei 558 nm) und bei 280 nm ist in Abbildung 35 dargestellt. Man erkennt deutlich eine stufenweise Abnahme des Maximums ($E_{558\ nm}$): zwischen 20° und 30°C sowie zwischen 40° und 50°C bleibt die Absorption nahezu konstant. Diese Stufe entspricht einer leichten, hypsochromen Verschiebung der gesamten Absorptionsbande. Eine stufenweise Absorptionsabnahme fanden auch Erokhina und Krasnovski (1968) beim R-Phycoerythrin, sowie Scheer und Kufer (1977) beim C-Phycocyanin. Für ein C-Phycocyanin einer thermotoleranten Alge fanden MacColl et al. (1978) dagegen eine konstante Absorption bis 50°C.

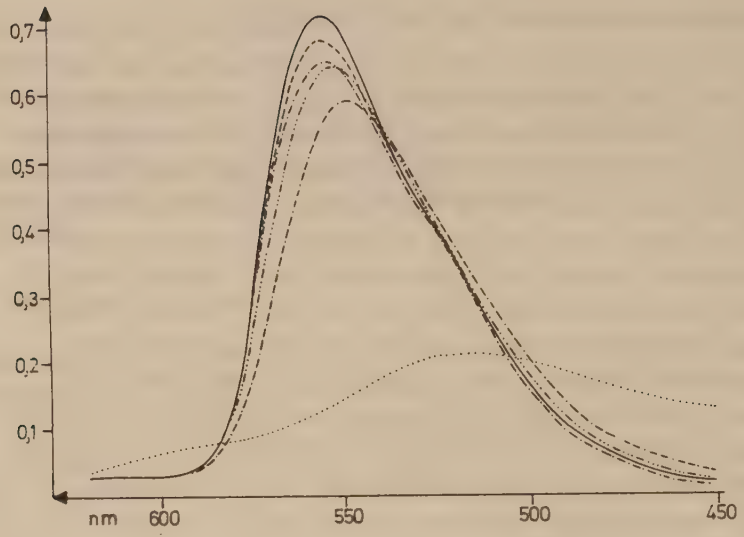

Abb. 34: Absorptionsspektren des C-Phycoerythrins bei der Hitzedenaturierung bei pH 7,0. —— 10°C, - - - 20 und 30°C, -.-.-.- 40°C, -...-...-...- 50°C, --.--.--. 60°C, ... bei 70°C. Die Spektren entsprechen Messungen 15 Minuten nach Temperatureinstellung.

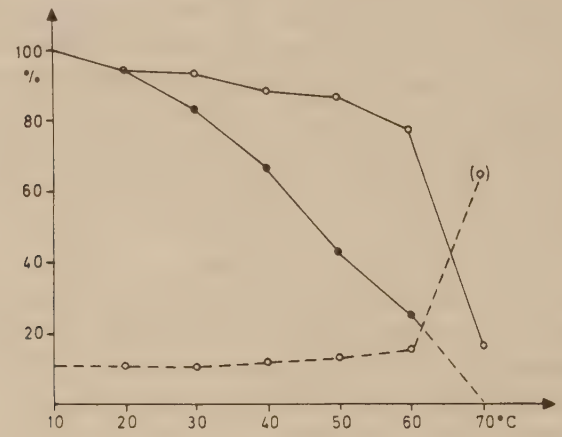

Abb. 35: Änderung der Absorption des C-Phycoerythrins bei 553 nm (—o—o—o—) und bei 280 nm (-o-o-o-) sowie der relativen Fluoreszenzquantenausbeuten (—•—•—•—) als Funktion der Temperatur. Die Fluoreszenzquantenausbeuten wurden auf gleiche Extinktion bei der Anregungswellenlänge (bei 550 nm) korrigiert. Die Werte entsprechen Meßdaten 15 Min. nach Temperatureinstellung.

Der Proteinpeak ($E_{280\ nm}$, Abb. 35) bleibt bis 30°C konstant und nimmt dann bis 60°C um etwa 1/3 zu. Die Zunahme der Extinktion bei 280 nm im Verlauf der Proteindenaturierung beruht auf einem zunehmenden Kontakt zwischen Lösungsmittel und aromatischen Aminosäuren, die während der Entfaltung an die Oberfläche gelangen (Lapanje 1976).

Insgesamt lassen sich drei verschiedene Prozesse unterscheiden:

1. Bis 30°C findet eine geringe Absorptionsabnahme im langwelligen Spektralbereich statt ($E_{558\ nm}$).
2. Ab 30°C, deutlich erst ab 40°C findet eine Proteinveränderung statt, die mit einer Abnahme der Oszillatorstärke und mit einer kurzwelligen Verschiebung der sichtbaren Absorptionsbande verbunden ist.
3 Ab 60°C findet eine drastische Umwandlung sowohl in der Hauptabsorptionsbande wie in der Proteinabsorption statt. Diese Änderungen beruhen auf einer irreversiblen Denaturierung, was zunächst an einer Trübung, später an einem Ausflocken der Lösung deutlich zu erkennen ist.

4.4.2. Sedimentationskonstanten

Tabelle 12: Sedimentationskonstanten von C-Phycoerythrin bei 5° und 40°C

Temperatur	Protein-konzentration [mg/ml]	$S_{20°, w}$
5°	0,512	$4,6 \times 10^{-13}$
40°	0,398	$4,8 \times 10^{-13}$
40°	0,108	$4,3 \times 10^{-13}$

Lösungsmittel: 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0.

Temperaturabfall sowie Temperaturanstieg bewirken eine geringe Dissoziation des vorwiegend dimeren C-Phycoerythrins (Tab. 12; vgl. Tab. 7). Ein entsprechendes Verhalten bei Temperaturabfall fanden Scott und Berns (1965) für C-Phycocyanin (Abnahme der 11S-Species sowie Zunahme der 7S-Species bei 9,9°C, pH 6, gegenüber der Verteilung bei 25°C). Bei Temperaturanstieg (von 25° auf 33,8°C) fanden diese Autoren eine geringe Aggregationstendenz. Im Gegensatz dazu beobachteten Kao und Berns (1977) für C-Phycocyanin aus einer thermotoleranten Blaualge eine geringe Dissoziationstendenz bei Temperaturanstieg (Meßwerte bei 25°, 37° und 50°C).

Monomeres C-Phycoerythrin (Tab. 12) bleibt bei 40°C unverändert im Sedimentationsverhalten (vgl. Tab. 7) ebenso wie monomeres C-Phycocyanin (Scheer, Kufer 1977).
Da bis 40° monomeres C-Phycoerythrin vorliegt, beruhen die beobachteten Absorptionsänderungen nicht auf einem Dissoziationsprozeß.

Die Extinktionsabnahme zwischen 10° und 20° beruht möglicherweise auf einer Linienverschmälerung durch Temperaturerniedrigung. Dieser Effekt ist deutlich sichtbar beim Tieftemperaturabsorptionsspektrum (-150°C) des C-Phycoerythrins (Abb. 36). Inwieweit hier zum Beispiel noch geringe Konformationsänderungen des Proteins eine Rolle spielen, kann anhand der vorliegenden Untersuchungen nicht entschieden werden.

Im Temperaturbereich zwischen 30° und 60° findet ein Übergang zu einer anderen Proteinkonformation statt, welcher einem

$$N \rightleftharpoons N''$$

Übergang entspricht. Die Bezeichnung N'' wurde gewählt, um diesen Zustand vom N'-Zustand, der bei der Harnstoffdenaturierung auftritt, zu unterscheiden. Da alle bis 60° beobachteten Spektraländerungen voll reversibel sind, entspricht der N''-Zustand einer stabilen Proteinkonformation (Meßzeit bis 25 Minuten) bei 60°C. Dieser Zustand wird über einen Stufenprozeß erreicht (Abb. 35).

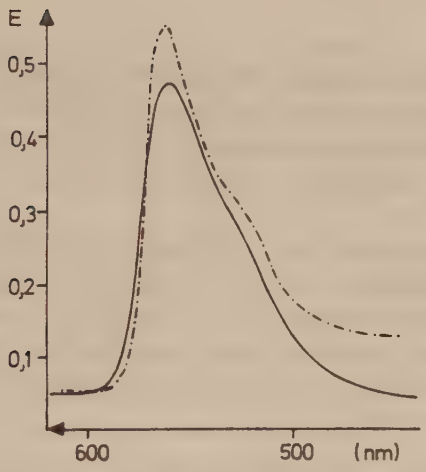

Abb. 36: Absorptionsspektrum des C-Phycoerythrins bei 20°C (———) und bei -150°C (-.-.-) in 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0 und Glycerin (1:2).

4.4.3. Fluoreszenz

Zwischen 10° und 70°C nimmt die relative Fluoreszenzquantenausbeute (Abb. 35) fast linear ab. Bei 70° wurde nach 15 Minuten keine Fluoreszenz mehr gemessen.

Einen ähnlichen Kurvenverlauf fanden Vernotte und Moya (1973) für monomeres C-Phycocyanin, allerdings wurde hier bereits bei 60°C keine Fluoreszenz mehr gefunden. Die relative Fluoreszenzabnahme beim C-Phycocyanin aus einer thermotoleranten Blaualge (Kao, Berns 1977) verläuft linear jedoch mit unterschiedlichen Steigungen von 30°-60°C und von 60°-75°C. Für R-Phycoerythrin (Erokhina, Krasnovski 1968) wurde dagegen eine konstante Fluoreszenz zwischen 30° und 60°C beobachtet.

Die Abnahme der Fluoreszenz kann auf einer Temperaturabhängigkeit der Quantenausbeute beruhen, wie sie zum Beispiel auch für einige stark fluoreszierende Farbstoffe (Rhodamin B und 6G, Acridinorange, Fluorescein; Förster 1951) gefunden wurde.

Ab 30°-40°C spielt der Prozeß der Proteinentfaltung eine zusätzliche Rolle. Hier kann zum Beispiel ein verstärkter Kontakt zwischen Chromophoren und Lösungsmittelmolekülen die Quantenausbeute der Fluoreszenz zusätzlich beeinflussen.

Die Fluoreszenzemissionsspektren sind beim C-Phycoerythrin bis 40°C untereinander identisch, ab 50° bis 60° wird jedoch eine geringe Verschiebung des Maximums auf 575 nm deutlich, ebenso taucht bei 50° eine sehr geringe Emission zwischen 520 und 560 nm auf. Bei 60°C ist diese deutlicher, das Emissionsspektrum ist insgesamt etwas verbreitert.

Die Erregerspektren sind bei 50° und 60° kurzwellig verschoben und entsprechen bis auf eine geringe Verbreiterung zwischen 560 und 600 nm den Absorptionsspektren. Im Gegensatz zur Alkalidenaturierung (Abb. 25) besteht bei 60°C auch im kurzwelligen Spektralbereich (480 bis 550 nm) eine gute Übereinstimmung zwischen Absorptions- und Erregerspektren.

Das Auftauchen der 's'-Fluoreszenz kann auf einer Dissoziation des C-Phycoerythrins in Untereinheiten beruhen. Die kurzwellige Verschiebung der Absorptions-, Fluoreszenzemissions- und Erregerspektren sowie der Anstieg der Proteinabsorption beruhen auf einer veränderten Proteinstruktur. Hierdurch wird die Chromophorkonformation ebenfalls verändert (Absorptionsspektrum, Erregerspektrum, verbreitertes Fluoreszenzemissionsspektrum). Außerdem findet eine Umorientierung oder räumliche Trennung von 's'- und 'f'-Chromophoren statt, was zu einer teilweisen Entkopplung des Energietransfers führt (geringe 's'-Fluoreszenz ab 50°C).

4.5. Diskussion

Die eigentliche Proteinentfaltungsreaktion ist nach den Absorptionsmessungen gekennzeichnet durch den Übergang von einer asymmetrischen Bande in eine unspezifische, hypsochrom verschobene Bande (λ_{max} zwischen 515 und 540 nm), verbunden mit dem Auftauchen einer Schulter zwischen 590 und 600 nm. Die mit dem Übergang verbundene Abnahme der Absorption am Maximum (Abb. 26, 30, 35) sowie die Abnahme der Sedimentationskonstanten bei der

Alkalidenaturierung ähneln Titrationskurven und entsprechen somit einem Übergang von einem Proteinzustand in einen anderen. In diesem Fall entspricht der Kurvenverlauf wahrscheinlich dem Übergang aus einer Tertiärstruktur in die bei voll entfalteter Proteinkette ("random coil"). Der Vergleich der Absorptionsspektren (Abb. 25, 32, 34) bei den drei angewendeten Methoden der Proteinentfaltung zeigt, daß der Zustand vor der eigentlichen Proteinentfaltungsreaktion (vgl. Spektrum bei pH 10,0, bei 60° und in 4 M Harnstoff) sich bei allen drei Methoden unterscheidet, zumindest in bezug auf die Chromophorzustände. Dies zeigt, daß die Proteinentfaltungsreaktionen über verschiedene Zwischenstufen verlaufen. Der deutlichste Unterschied zwischen der Harnstoffdenaturierung und der Hitze- und Alkalidenaturierung besteht darin, daß bei der Harnstoffdenaturierung die Asymmetrie der sichtbaren Absorptionsbande ab 4 M Harnstoff kontinuierlich verloren geht.

Solange noch die Asymmetrie der Bande vorhanden ist, lassen sich Absorptions- und Erregerspektren annähernd zur Deckung bringen. Ein Energietransfer von 's'- zu 'f'-Chromophoren ist bei dieser Protein- und entsprechend auch Chromophorkonformation noch möglich.

Wie aus den Fluoreszenzemissions- und erregerspektren eindeutig hervorgeht, entspricht das Absorptionsspektrum bei entfalteter Proteinkette einer Überlagerung mehrerer Komponenten. Die Fluoreszenzemissionsspektren zeigen, daß zumindest noch native 'f'-Chromophore vorhanden sind. Das Auftauchen einer langwelligen Schulter (bei der Alkalidenaturierung zwischen 620 und 630 nm, bei der Harnstoffdenaturierung zwischen 600 und 620 nm) zeigt, daß noch eine weitere fluoreszierende Komponente vorhanden ist. Aus den Erregerspektren geht hervor, daß diese Fluoreszenz bei Anregung zwischen 590 und 600 nm erfolgt.

Bei allen drei Methoden wird bei zunehmender Proteinentfaltung, am deutlichsten bei der Harnstoffdenaturierung, eine geringe Fluoreszenz im kurzwelligen Spektralbereich deutlich. Der Energietransfer von 's'- zu 'f'-Chromophoren ist somit teilweise entkoppelt, so daß eine Eigenemission von 's'-Chromophoren als Konkurrenzprozeß stattfindet.

Während bei der beginnenden Proteinentfaltung die Absorption zunächst relativ wenig beeinflußt wird, nimmt die Fluoreszenz in allen drei Fällen wesentlich stärker ab. Das bedeutet, daß schon geringe Störungen der nicht-kovalenten Bindungen zwischen Protein und Chromophor bewirken, daß statt der Fluoreszenz zunehmend strahlungslose Desaktivierungsprozesse möglich werden. Da bei der Alkali- und Hitzedenaturierung die Asymmetrie der Absorptionsbande zunächst erhalten bleibt, und sich nur eine mehr oder weniger stark ausgeprägte hypsochrome Verschiebung der Bande sowie eine Abnahme der Oszillatorstärke zeigt, scheinen hier 's'- und 'f'-Chromophore gleichermaßen verändert zu werden. Dafür spricht auch, daß nur eine sehr geringe Entkopplung des Energietransfers stattfindet. Bei der Harnstoffdenaturierung entspricht die Änderung der Absorptionsbande bei der eigentlichen Proteinentfaltungsreaktion (ab 5 M Harnstoff, Abb. 32) einer stärkeren Abnahme im langwelligen Spektralbereich, so daß hier 'f'-Chromophore bevorzugt verändert werden.

4.6. Oxidationsreaktionen des C-Phycoerythrins

Die Oxidation wurde untersucht, um folgende Fragen zu klären:

1. Wie verhält sich natives C-Phycoerythrin gegenüber Oxidationsmitteln?
2. Findet eine bevorzugte Oxidation von 's'- oder 'f'-Chromophoren statt?

Zu 1):

Gegenüber geringen Konzentrationen an Oxidationsmitteln ist natives C-Phycoerythrin sehr stabil. Bei einer 1×10^{-6} molaren Lösung in 10^{-4} M Kaliumhexacyanoferrat-(III) (Aufbewahrung bei $4^{\circ}C$, pH 7,0) findet lediglich eine Extinktionsabnahme auf 95-93 % statt. Da eine Vergleichslösung auf den gleichen Werten abgesunken war, beruht diese Extinktionsabnahme nicht auf einem Einfluß des Oxidationsmittels.

Zu 2):

Die Oxidation wurde mit folgenden Oxidationsmitteln untersucht: a) Jodlösung, b) Cer-IV-Sulfat, c) Kaliumhexacyanoferrat-(III) und d) Benzochinon, wobei die Reaktionen mit c) und d) eingehender untersucht wurden.

Qualitativ lassen sich die beobachteten Oxidationsreaktionen mit den Oxidationsmitteln a) - c) zusammenfassen, da die Reaktionen in gleicher Weise abliefen. Deshalb werden hier nur die Untersuchungen mit Kaliumhexacyanoferrat-(III) beschrieben. Da mit Benzochinon eine andere Reaktion eintrat, wird auf diese anschließend eingegangen.

4.6.1. Oxidation mit Kaliumhexacyanoferrat-(III)

In Abb. 37 a sind die Absorptionsspektren einer 10^{-6} M C-Phycoerythrin-Lösung in 10^{-3} M Kaliumhexacyanoferrat-Lösung-(III) bei pH 7,0 nach stufenweiser Belichtung dargestellt. Wie aus Abb. 37a hervorgeht, findet eine schnelle Abnahme der sichtbaren Absorptionsbande statt. Außerdem tritt eine geringe Extinktionszunahme bei 460 nm auf. Im berechneten Differenzspektrum (Abb. 37 b) ist diese deutlich als negativer Peak zu erkennen. Es entstehen bei der Reaktion Chromophore vom Typ des Urobilins. Freies Urobilin absorbiert als Base bei 450 nm und als Kation bei 498 nm (Köst 1974). Urobilin (Abb. 38) unterscheidet sich vom Mesobilirhodin IXα (Abb. 27) (Modellchromophor für Phycoerythrobilin) durch die Einfachbindung zwischen Ring I und II. Somit muß beim Phycoerythrobilin der Angriff am C_4 und C_5 stattgefunden haben. Eine analoge Reaktion (Angriff an der Doppelbindung zwischen Ring I und II) wurde bei Modellchromophoren vom Typ der Bilivioline mit Jod gefunden (C.Krauss, persönliche Mitteilung). Der Reaktionsablauf konnte hier im Sinne einer oxidativen Addition an die Doppelbindung aufgeklärt werden.

Beim C-Phycoerythrin trat außerdem eine geringe Extinktionszunahme unter 300 nm auf. Somit entstehen bei der Oxidation auch farblose Spaltprodukte.

Da das Differenzspektrum weder eine Verschiebung des Maximums noch eine veränderte Form gegenüber dem Ausgangsspektrum (zwischen 500 und 600 nm) aufweist, kann man im Rahmen der Fehlergrenze auf eine statistische Reaktion aller Chromophore schließen.

Die Oxidation wurde außerdem bei 50° bzw. 60°C durchgeführt (Abb. 39). Die Reaktion wird durch das Erwärmen beschleunigt.

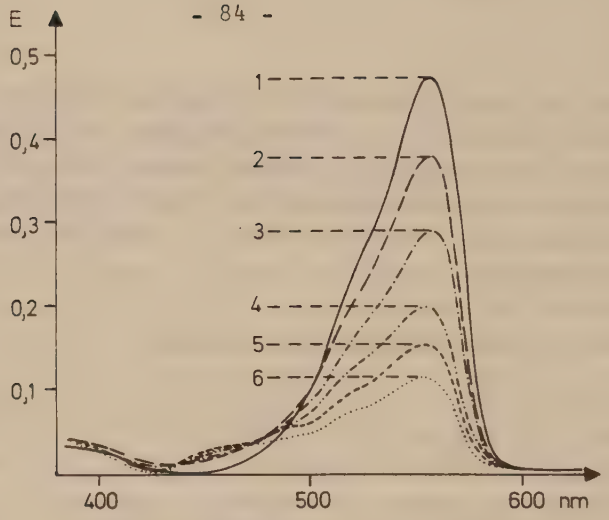

Abb. 37 a: Absorptionsspektren des C-Phycoerythrins nach Oxidation mit Kaliumhexacyanoferrat-(III) und Belichtung (Weißlicht). 1) Ausgangswert 2) nach 30 Sekunden Belichtung 3) 60'' 4) 90'' 5) 120'' 6) 150''; in 10^{-3} M Kaliumhexacyanoferrat-(III) bei pH 7,0.

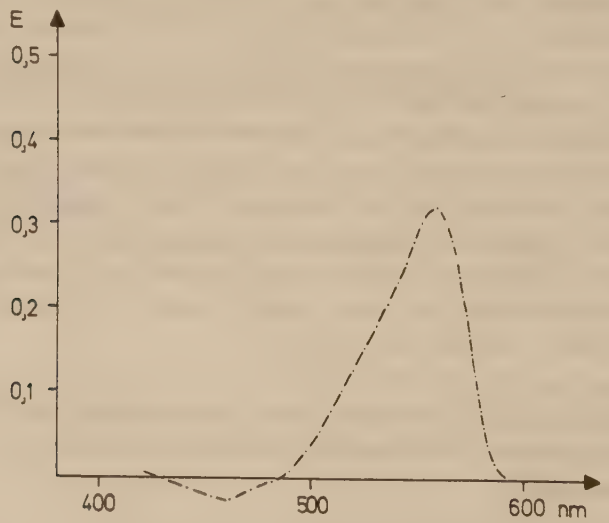

Abb. 37 b: Berechnetes Differenzspektrum von 1 und 5 (Abb. 37 a).

Dennoch kann man anhand der Spektren nur auf ein gleichmäßiges Ausbleichen aller Chromophore schließen. Eine selektive Oxidation von 's'- oder 'f'-Chromophoren findet nicht statt.

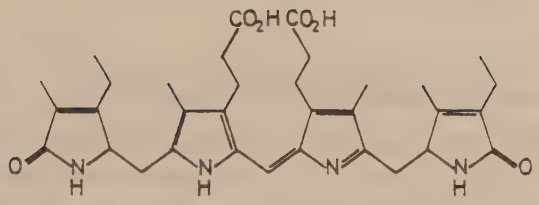

Abb. 38: Urobilin IXα

Die gleiche Reaktion wurde auch in 3,5 M Harnstoff pH 7,0 durchgeführt. Die Reaktion verlief sehr schnell. Nach dem Absorptionsspektrum, das sofort nach Vermischen des C-Phycoerythrins mit der Harnstofflösung aufgenommen wurde, war die Lösung z.B. bis auf 37 % des Ausgangswertes ausgeblichen (vgl. dazu Abb. 32, C-Phycoerythrin in 4 M Harnstoff nach 90 Minuten). Auf eine Abbildung wurde verzichtet, da die Spektren qualitativ identisch waren wie Spektrum 3 in Abb. 39.
Alle oxidierten Lösungen zeigten auch nach starkem Ausbleichen noch eine Fluoreszenz.

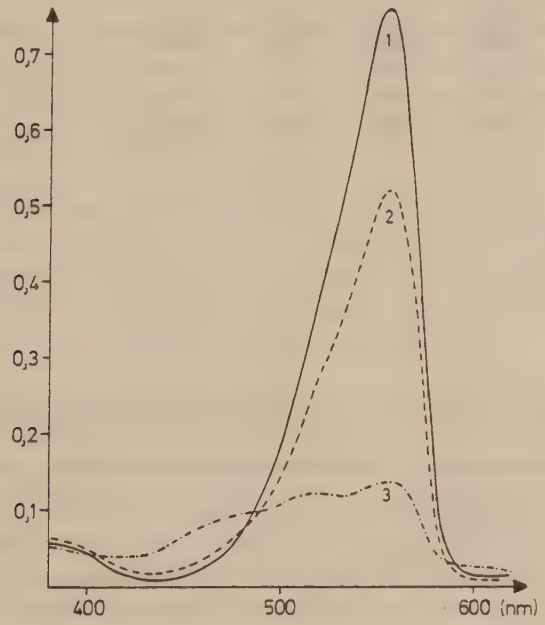

Abb. 39: Absorptionsspektren des C-Phycoerythrins nach Oxidation mit Kaliumhexacyanoferrat-(III) und Erwärmen auf 50°C bzw. 60°C.
——— Ausgangslösung, ----- bei 50°C, -.-.-.- bei 60°C, in 10^{-4}M Kaliumhexacyanoferrat-(III), pH 7,0.

4.6.2. Trypsinabbau von oxidiertem C-Phycoerythrin

Der Trypsinabbau wurde durchgeführt, nachdem C-Phycoerythrin wie in Abschnitt 4.5.1. beschrieben, oxidiert worden war. Mit Hilfe des Trypsinabbaus sollte noch einmal geprüft werden, ob tatsächlich eine statistische Oxidation der Chromophore stattgefunden hat. Beim Trypsinabbau werden Proteine durch Angriff des Enzyms Trypsin an basischen Aminosäuren verdaut. Beim C-Phycoerythrin können die dabei auftretenden Peptide, die noch einen Chromophor tragen, bei der isoelektrischen Fokussierung leicht an der Farbe erkannt und identifiziert werden. Wie die ausführlichen Untersuchungen von Muckle (1978) gezeigt haben, tauchen dabei allerdings gewisse Schwierigkeiten auf. Beim Trypsinabbau bilden sich nur einige Peptide reproduzierbar (siehe Abb. 40 mit 1-5 bezeichnete Banden). Durch zusätzliche

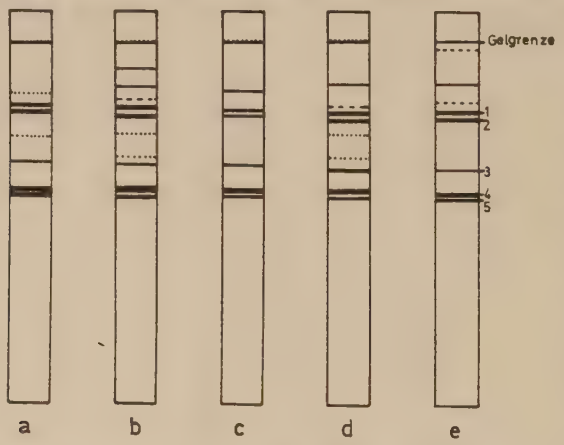

Abb. 40: Isoelektrische Fokussierung bei pH 2-11 von C-Phycoerythrin nach unterschiedlich starker Oxidation mit Kaliumhexacyanoferrat-(III) und tryptischem Abbau. Mit 1-5 bezeichnete Banden entsprechen reproduzierbaren Chromopeptiden (siehe Text). ———, ---- rotgefärbte Banden, ... gelblich gefärbte Banden. Die Oxidation führte zu einer Extinktionsabnahme bis auf a) 12 %, b) 50 %, c) 73 % und d) 37 % des Ausgangswertes. Bei a) bis c) wurde die Oxidation bei 50°C durchgeführt. Bei d) wurde die Oxidation in 3,5 M Harnstoff, pH 7,0 durchgeführt. e) Digest von nativem C-Phycoerythrin zum Vergleich.

Spaltprodukte an nicht-basischen Aminosäuren entstehen weitere Chromophor-tragende Peptide, so daß mehr als die zu erwartenden fünf (entsprechend der Chromophorzahl) rot gefärbten Peptide entstehen. Leider variieren auch die Konzentrationen der entstandenen Peptide je nach Abbau. Die densitometrische Auswertung der einzelnen Zonen ist ebenfalls schwierig, da die Zonen sehr eng beieinander liegen.

Mit Hilfe der hier angewendeten Methode kann also nur festgestellt werden, ob ein oder einige der mit 1-5 bezeichneten Banden durch die Oxidation vollständig ausgeblichen bzw. umgewandelt sind und somit ganz fehlen oder nicht. Die Methode ist zu schlecht reproduzierbar, um ein partielles Ausbleichen einer oder mehrerer Chromopeptide feststellen zu können.

In Abbildung 40 sind einige Beispiele dargestellt. Die Lösungen waren zum Teil bis auf 12 % des Ausgangswertes ausgeblichen (Gel a). Das entspräche unter Annahme gleicher Oszillatorstärke aller Chromophore einem Ausbleichen von mindestens vier Chromophoren. Dennoch sind auch hier alle reproduzierbaren Chromopeptide deutlich zu erkennen. Daraus kann man nur schließen, daß hier alle Chromophore im gleichen Maße oxidiert wurden.

Zusätzlich tauchen gelblich gefärbte Zonen auf, Peptide mit urobilinoidem Chromophor. Diese Peptide unterscheiden sich in ihren Laufstrecken und somit in ihren isoelektrischen Punkten von den normalen Peptiden. Ein Grund hierfür kann im unterschiedlichen pK-Wert des neuen Chromophors liegen.

4.6.3. Oxidation mit Benzochinon

Im Gegensatz zum Kaliumhexacyanoferrat-(III) tritt mit Benzochinon bei nativem C-Phycoerythrin keine Oxidation zu urobilinoiden Pigmenten auf. Auch beim Belichten oder Erwärmen der Lösungen findet keine Reaktion statt.

Stattdessen nimmt die Fluoreszenz ab. Die Abnahme der Fluoreszenz kann beschleunigt werden durch Belichten oder Erwärmen. Optisch kann man diese sehr gut an einer Rotfärbung der Lösung erkennen. Das Benzochinon wirkt also als Fluoreszenzquencher. Die relativ lipophile Substanz tritt mit den fluoreszierenden Chromophoren in Wechselwirkung, so daß eine strahlungslose Desaktivierung erfolgt. Dabei bleibt das Absorptionsspektrum des C-Phycoerythrins unverändert. Das Quenchen der Fluoreszenz beruht demnach auf einem photophysikalischen Prozeß und ist weder auf eine Oxidation der Chromophore noch auf eine Proteindenaturierung zurückzuführen.

Dagegen tritt mit Benzochinon (kaltgesättigte Lösung) in 6 M Harnstofflösung bei pH 3,0 eine geringe Umwandlung der Chromophore zu urobilinoiden Pigmenten auf (Schulter um 495 nm).

5. Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Die α- und ß-Untereinheiten des C-Phycoerythrins (aus Pseudanabaena W 1173) wurden durch Ionenaustauschchromatographie isoliert und durch Gelfiltration renaturiert.
2. Die Addition der Absorptionsspektren der renaturierten Untereinheiten bei gleicher Proteinkonzentration ergibt eine Bande, die identisch ist mit dem Absorptionsspektrum des monomeren, nativen C-Phycoerythrins.
3. Das Verhältnis der Oszillatorstärken (Fläche der Absorptionsbande zwischen 460 und 620 nm) nativ bzw. renaturiert zu denaturiert ist im C-Phycoerythrin sowie in der α- und ß-Untereinheit gleich groß (f = 1,4).
   Aus 2 und 3 folgt, daß die Konformation der Chromophore identisch ist in den renaturierten Untereinheiten und im nativen, monomeren C-Phycoerythrin.
4. Für die molaren Extinktionskoeffizienten der α- und ß-Untereinheiten wurden Werte von $\varepsilon_{566\ nm}$ = 151 000 ± 7 % für die α-Untereinheit und von $\varepsilon_{557\ nm}$ = 266 000 ± 7 % für die ß-Untereinheit gefunden.
5. Der isoelektrische Punkt der α-Untereinheit liegt bei pI. 5,31 ± 0,04, der der ß-Untereinheit bei 5,01 ± 0,05.
6. Für die absoluten Fluoreszenzquantenausbeuten wurden folgende Werte gefunden: C-Phycoerythrin, nativ 0,75 ± 0,07, C-Phycoerythrin, renaturiert 0,49 ± 0,11, α-Untereinheit 0,51 ± 0,05 und für die ß-Untereinheit 0,56 ± 0,05.
7. Die Fluoreszenzquantenausbeuten sind unabhängig von der Erregerwellenlänge (510-570 nm).
8. Die Bestimmung der nativen Molekulargewichte durch Gelchromatographie und durch Sedimentationsgleichgewichtsanalyse ergab, daß C-Phycoerythrin bis zu einer Konzentration von 0,3 mg/ml ($0{,}7 \times 10^{-5}$ M) als Monomeres vorkommt und in Konzentrationen von 1,5 - 2,0 mg/ml (4×10^{-5} M) überwiegend in der dimeren Form vorliegt.
9. Die Untereinheiten liegen als Monomere in Lösung vor (untersuchte Konzentration 0,4 - 0,5 mg/ml).

10. Außerdem wurden die Sedimentationskoeffizienten vom C-Phycoerythrin in verschiedenen Konzentrationen und unter verschiedenen denaturierenden Bedingungen sowie von den Untereinheiten bestimmt.
11. Die Fluoreszenzpolarisationsgraderregerspektren und die fehlende Spiegelsymmetrie zwischen Absorptionsspektren (sichtbare Bande) und Fluoreszenzemissionsspektren zeigen, daß sowohl im C-Phycoerythrin wie in den Untereinheiten Chromophore des 's'- und 'f'-Typs vorkommen.
12. Die nahezu vollständige Übereinstimmung zwischen Absorptions- und Erregerspektren, das fast vollständige Fehlen einer Fluoreszenz von 's'-Chromophoren sowie die Unabhängigkeit der Fluoreszenzquantenausbeute als Funktion der Erregerwellenlänge zeigen, daß ein Energietransfer mit einer Wahrscheinlichkeit nahe bei 1 von 's'- zu 'f'-Chromophoren stattfindet.
13. Die Fluoreszenzemissionsspektren bei Raum- und Tieftemperatur (bei 4 K) der α- und ß-Untereinheiten zeigen, daß die fluoreszierenden Chromophore der Untereinheiten fast identisch sind in bezug auf Energie und Linienform. Das Emissionsspektrum des C-Phycoerythrins konnte als eine Überlagerung der Fluoreszenz beider Untereinheiten interpretiert werden. Das heißt, daß in monomerem C-Phycoerythrin sowohl der 'f'-Chromophor der α- wie auch der der ß-Untereinheit fluoresziert. Bei der α-Untereinheit und in sehr geringem Maße auch im C-Phycoerythrin konnte bei 4 K eine Fluoreszenzemission beobachtet werden, die den 's'-Chromophoren zugeordnet wurde. Die Fluoreszenzmessungen zusammen mit den Absorptionsspektren konnten in folgender Weise übereinstimmend interpretiert werden:
    a) im C-Phycoerythrin gibt es zwei fluoreszierende Chromophore, die bei gleicher Energie emittieren, einen in der α-Untereinheit und einen in der ß-Untereinheit und drei sensitisierende Chromophore, die sich in der Energie und Linienform unterscheiden, zwei in der ß-Untereinheit und einen in der α-Untereinheit.
    b) Die absorbierte Energie wird nicht nur innerhalb der Untereinheiten transferiert, sondern auch zwischen beiden hin und her.

14. Zur Überprüfung der Aussagen wurde eine Berechnung der Fluoreszenzpolarisationsgraderregerspektren durchgeführt. Durch die Übereinstimmung der Berechnung mit den Experimenten konnten die Aussagen bestätigt werden.
15. Bei der Proteindenaturierung durch pH-Änderung wurde beim C-Phycoerythrin eine Dissoziation und Proteinentfaltung zwischen pH 9 und 10,6 beobachtet. Aus Absorptions- und Fluoreszenzmessungen geht hervor, daß der Prozeß der Proteinentfaltung im wesentlichen erst ab pH 10 verläuft. Dabei taucht eine zweite, langwelliger absorbierende und fluoreszierende Komponente auf. Im sauren pH-Bereich bleibt C-Phycoerythrin bis pH 5,0 stabil.
16. Bei der Proteindenaturierung durch Harnstoff bleibt C-Phycoerythrin bis zu einer 3 molaren Harnstoffkonzentration nahezu unverändert. In 4 M Harnstoff liegt das Protein dissoziiert vor. In 7 M Harnstoff tauchen im Fluoreszenzemissionsspektrum um 550 und zwischen 600 und 620 nm Schultern auf. Die kurzwellige Schulter entspricht einer Entkopplung des Energietransfers zwischen 's'- und 'f'-Chromophoren, die langwellige Schulter ist wahrscheinlich auf Chromophore, die als Zinkkomplex vorliegen, zurückzuführen. Aus Absorptions- und Erregerspektren sowie aus der Messung der relativen Fluoreszenzquantenausbeute geht hervor, daß ein Teil der kurzwellig absorbierenden Chromophore weder fluoresziert noch am Energietransfer beteiligt ist.
17. Die Proteindenaturierung durch Temperaturerhöhung wurde in einem Temperaturbereich zwischen 10° und 70°C untersucht. Die Absorptions- und Fluoreszenzmessungen ließen sich dahingehend übereinstimmend interpretieren, daß bis 60°C eine reversible Konformationsänderung des Proteins stattfindet, die zu einer hypsochromen Verschiebung des Absorptions-, Fluoreszenzemissions- und erregerspektrums führt. Ab 60°C beginnt eine irreversible Proteindenaturierung, welche an einem Ausflocken der Lösung deutlich zu erkennen ist.

18. Die Renaturierung nach Harnstoffdenaturierung wurde nach folgenden Kriterien untersucht: spezifischer Extinktionskoeffizient, Reinheitsgrad, isoelektrischer Punkt und Fluoreszenzquantenausbeute. Dabei erwies sich die Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute und die Bestimmung des isoelektrischen Punktes als empfindlichstes Indiz für eine erfolgreiche Renaturierung. Bezogen auf die Absorption erfolgte unter den angegebenen Bedingungen nach Harnstoff, nach Alkali- und nach Hitzedenaturierung eine vollständige Renaturierung.
19. Bei der Oxidation des C-Phycoerythrins wurde eine teilweise Umwandlung der Chromophore zu urobilinoiden Pigmenten beobachtet. Im Rahmen der Fehlergenauigkeit verlief die Oxidationsreaktion statistisch, d.h. 's'- und 'f'-Chromophore wurden gleichermaßen oxidiert.
20. Bei der Zugabe von Benzochinon zu nativem C-Phycoerythrin wurde ein Quenchen der Fluoreszenz beobachtet.

6. Experimenteller Teil

6.1. Algenanzucht

Herr R. Wagenmann stellte uns freundlicherweise eine Stammkultur der Blaualge Pseudanabaena W 1173 zur Verfügung.

6.1.1. Stammkulturen

Die Algen wurden auf Schrägagarröhrchen und Agarplatten kultiviert. Die Stammkulturen wurden in einem Zimmer, das in nördlicher Richtung lag, im normalen Tag-/Nachtrhythmus in 1 bis 2 m Abstand vom Fenster bei Raumtemperatur angezogen. Die Kulturen wurden alle sechs bis acht Wochen überimpft.

6.1.2. Kolbenkulturen

Zur Anzucht größerer Algenmengen wurde auf Flüssigkulturen überimpft. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen: Zunächst wurden die Algen auf Nährmedium in 50 oder 100 ml Erlenmeyerkolben überimpft. Diese wurden in den ersten Tagen im oberen Teil mit Alufolie umwickelt, um die Algen vor Licht zu schützen. Hatte sich ein kräftiges Wachstum eingestellt, wurde der Lichtschutz entfernt. Nach ein bis zwei Wochen wurden die Algen auf 200-300 ml Erlenmeyerkolben überimpft. Ließ man die Algen länger als 4-6 Wochen in Kolbenkulturen wachsen, so wurden Waschvorgänge zwischengeschaltet. Alle Kolbenkulturen wurden auf einer Schüttelmaschine (Wagenmann 1977) bei Raumtemperatur und bei Dauerlicht kultiviert. Als Lichtquelle wurde eine 40 Watt Leuchtstoffröhre verwendet, die über dem Schüttelapparat angebracht war. Die Lichtintensität in Höhe der Nährmediumoberfläche betrug 800-1000 Lux.

6.1.3. Flaschenkulturen

Für die Anzucht in Flaschen wurden 3 l-Anzuchtröhrchen verwendet. Diese wurden mit 2-2,5 l Nährmedium gefüllt. Zum Animpfen wurden ein bis zwei Kolbenkulturen (200 ml) pro Flasche benötigt. Die

Anzuchtflaschen wurden in ein mit Wasser gefülltes Algenzuchtbecken gestellt (Köst 1974). Die Temperatur im Becken lag zwischen 18° und 22°C. Zur Belichtung wurden grüne Leuchtstoffröhren der Firma Osram (L 40/W/63) verwendet. Das emittierte Licht zeigt eine spektrale Verteilung zwischen 500 nm und 600 nm mit einem Maximum bei 530 nm. Die durchschnittlich eingestrahlte Lichtenergie betrug auf der Innenseite des Beckens 5500 erg/cm/sec (Wagenmann 1977).
Während des Wachstums wurden die Algen mit einem Gemisch aus 97 % Preßluft und 3 % Kohlensäure versorgt. Die Regulation des Gasgemisches wurde mit Hilfe eines Kapillarsystems erreicht. Dabei wurde die Preßluft durch eine 5 cm lange Metallkapillare und die Kohlensäure durch eine 150 cm lange Metallkapillare mit einem Druck von 1,5 Kp/cm^2 geleitet. Die Reinigung des Gasgemisches erfolgte durch Vorschalten eines sterilisierten, mit Watte gefüllten Stahlfilters.
Die Wachstumsdauer betrug durchschnittlich acht bis zehn Tage.

6.1.4. Tonnenkulturen

Zur Anzucht auf Tonnen wurden 80 l PVC-Plastikbehälter mit Deckel verwendet. Diese wurden gründlich gewaschen und mit Alkohol ausgewischt, um Keimfreiheit zu erzielen. Belichtet wurde mit Hilfe von zwei 40 Watt starken Leuchtstoffröhren, die sich in verschließbaren Glasröhren befanden und durch zwei Bohrungen im Deckel in die Tonne eingebracht wurden. Belüftet wurde wiederum mit einem 3 % Kohlensäure/Luftgemisch.
Die Algenanzucht erfolgte stufenweise. Zunächst wurden 15-20 l Nährmedium mit einer Flaschenkultur angeimpft. Dann wurde in entsprechenden Abständen zwei- bis dreimal je 10 l Medium hinzugefügt. Nach etwa zwei Monaten war ein ausreichendes Wachstum erreicht.

Die Anzucht auf Tonnen erwies sich im Verlauf der Arbeit als ungünstig, da die Kontamination durch Bakterien zu stark war. Die mikroskopische Betrachtung zeigte, daß das Algenmaterial einen großen Anteil an kurzkettigen Fäden enthielt und ein Teil der

Zellen zerstört war. Die Ausbeute an löslichen Biliproteiden im Rohextrakt pro Gramm Naßgewicht war nur etwa halb so hoch wie bei Flaschenkulturen. Deshalb wurden die Algen später nur noch auf Flaschenkulturen angezogen.

6.1.5. Erntebedingungen

Die Algen wurden in Kühlzentrifugen (Firma WKF, G 50 K) 30 Minuten bei 18 000 g abzentrifugiert, in 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0 aufgeschlämmt und nochmal bei 35 000 g abzentrifugiert. Zur Ernte des Tonnenmaterials wurde ein Durchflußrotor bei 13000 g verwendet. Auch dieses Algenmaterial wurde in 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0 suspendiert und nochmals abzentrifugiert. Die Algen wurden bei -15°C aufbewahrt.

6.1.6. Nährmedium

Medium B I_1 (Wagenmann 1977):

I	$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	250	mg
	$Ca(NO_3)_2$	25	mg
	KNO_3	1,0	g
	$Fe(SO_4)_3$	2	mg
II	K_2HPO_4	1,0	g
III	Spurenelemente	1	ml
IV	Fe/EDTA-Lösung	1	ml
	Aqua dest.	1000	ml

Spurenelementlösung:

$ZnCl_2$	40	mg
H_3BO_3	600	mg
$CoCl_2 \times 6\ H_2O$	15	mg
$CaCl_2 \times 2\ H_2O$	40	mg
$MnCl_2 \times 2\ H_2O$	40	mg
$(NH_4)_2MoO_4$	370	mg
Aqua dest.	ad 1000	ml

Eisen/EDTA-Lösung:

$FeCl_3 \times 6\ H_2O$	2,4 g
Na_2EDTA	18,6 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

Zur Herstellung von Agarplatten und Schrägagarkulturen wurde vor dem Autoklavieren zu Lösung I 4,75 g Agar (Agar-Agar, Firma Serva) hinzugefügt. Die Lösungen I, II, III und IV (Medium B I_1) wurden getrennt autoklaviert (Dampfdrucksterilisation bei 120°/ 1 atü) und nach dem Abkühlen gemischt.

6.1.7. Geräte und Sterilisation

Für Schrägagarkulturen wurden dickwandige Reagenzgläser (1,6 x 16 cm) mit Kapsenbergkappen verwendet, für Plattenkulturen Petrischalen aus Plastik, Durchmesser 9 cm. Die Erlenmeyerkolben wurden mit Zellstopfstopfen verschlossen und mit Alufolie abgedeckt. Die Anzuchtröhren wurden mit zweifachdurchbohrten Gummistopfen mit je einem Be- und Entlüftungsrohr verschlossen.
Alle verwendeten Glasgeräte sowie Nährmedium B I_1 wurden im Dampfdruckverfahren bei 120° entsprechend 1 atü im Autoklaven (Vapoklav 400 E, Firma Sterico) sterilisiert. Die reine Sterilisationszeit betrug 20 Minuten.
Alle Gummimaterialien wurden durch 24-stündiges Erhitzen im Trockenschrank (Firma Memmert TV 80 UL) bei 100°C keimfrei gemacht. Vor dem Überimpfen wurde der dafür vorgesehene Arbeitsplatz gründlich gesäubert und mit einer UV-Lampe einige Stunden belichtet.

6.2. Isolierung und Reinigung vom C-Phycoerythrin

6.2.1. Herstellung des Rohextraktes

Die aufgetauten Algenzellen wurden mit Glasperlen (Ø 0,25 mm, Firma Roth) im Verhältnis 1:10 pro Gramm Algen (Naßgewicht) vermischt, das Gemisch in einen Bechereinsatz der Vibrogenzellmühle (Firma Bühler, Tübingen) gefüllt und für ca. 10 Minuten bei -15°C

eingefroren. Anschließend wurde der Becher in die Vibrogenzellmühle gestellt und bei höchster Schüttelfrequenz mit Wasserkühlung 5-10 Minuten geschüttelt. Alle wasserlöslichen Zellinhaltsstoffe wurden mit auf 4°C gekühltem 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0 eluiert. Dabei wurde das Algen-Glasperlengemisch dreimal mit kleinen Mengen Puffer extrahiert. Die Zellreste und Glasperlen wurden zwischendurch mit einer Tischzentrifuge (Typ II KS-Christ) sedimentiert (1/2-1 Minute, 7000 Upm) und der so erhaltene Rohextrakt bei 42 000 g, 30 Minuten bei 4°C abzentrifugiert.
Während der Herstellung des Rohextraktes wurden alle Lösungen gekühlt, um ein Erwärmen zu vermeiden. Pro Aufarbeitung wurden 15-20 g Algen verwendet, pro Gramm Algen wurden 18-22 ml Rohextrakt erhalten.
Alle weiteren Arbeiten wurden in der Kühlkammer bei 4°C durchgeführt
Der erhaltene Rohextrakt wurde sofort einer 30 %igen Ammoniumsulfatfällung unterworfen (Fällung innerhalb 30-60 Minuten), die Fällung nach 1 1/2-2-stündigem Stehenlassen im Dunkeln in einer Kühlzentrifuge bei 35 000 g, 30 Minuten abzentrifugiert.

6.2.2. Gelfiltration mit Sephadex G-100

G-100 Puffer: 0,01 M Tris-HCl, 0,1 M KCL, 1 mM Natriumazid, 1 mM EDTA, pH 7,0; Sephadex-G-100: Pharmacia Fine Chemicals
Glassäule: Ø 10,6 cm, Füllhöhe 45 cm.
Der abzentrifugierte Niederschlag wurde in einem Fünftel des ursprünglichen Volumens in G-100-Puffer gelöst. Dann wurde 1 1/2 Stunden gegen Aqua bidest. dialysiert, bis die Leitfähigkeit der Proteinlösung der des G-100-Puffers entsprach (10 mS). Diese Lösung wurde auf eine äquilibrierte Sephadex G-100-Säule aufgetragen und mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 150-200 ml/Stunde eluiert. Laufrichtung: von unten nach oben. Das Eluat wurde in einem Fraktionssammler (Firma Gilson) in 10-14 ml Fraktionen aufgefangen. Anschließend wurde durch photometrisches Ausmessen der einzelnen Fraktionen (bei 280, 560 und 620 nm) ein Elutionsdiagramm erstellt und dieses zur Beurteilung der Auftrennung und des Reinheitsgrades herangezogen. Der Reinheitsgrad der vorgereinigten Phycoerythrin-Fraktion lag zwischen 4,5 und 6,0. Die Phycoerythrin-haltigen Fraktionen wurden gesammelt und einer 50 %igen Ammoniumsulfatfällung unterworfen.

6.2.3. Ionenaustauschchromatographie mit DEAE-Cellulose

DEAE-Startpuffer: 0,1 M Tris-HCl, 1 mM Natriumazid, 1 mM EDTA, pH 7,0; DEAE-Cellulose: Firma Serva, Servacel-DEAE-23 SS
Säulen: Ø 2,5 cm, Füllhöhe 25-30 cm.
Der Niederschlag der 50 %igen Ammoniumsulfatfällung wurde nach dem Abzentrifugieren in wenig DEAE-Startpuffer gelöst (Volumeneinengung auf etwa 1/8 der Ausgangslösung). Anschließend wurde 2 x 30 Minuten gegen Aqua bidest. und 2 x 30 Minuten gegen DEAE-Startpuffer dialysiert. Die Leitfähigkeit der dialysierten Lösung lag zwischen 4,5-5 mS und entsprach somit der des verwendeten Puffers (5 mS).
Die dialysierte Lösung wurde geteilt und auf zwei äquilibrierte DEAE-Säulen aufgetragen. Zunächst wurde mit DEAE-Startpuffer 1 1/2-2 Stunden eluiert, um das Phycocyanin weitgehend herauszuwaschen. Dann wurde mit einem linearen Salzgradienten von 0-0,3 M KCl in DEAE-Startpuffer eluiert. Das Eluat wurde in 5-7 ml Fraktionen aufgefangen. Die Säulen wurden mit Pumpen der Firma Gilson betrieben. Alle Phycocyanin-freien Phycoerythrin-Fraktionen mit einem Reinheitsgrad über 6,3 wurden gesammelt und einer 60 %-igen Ammoniumsulfatfällung unterworfen. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und je nach Proteinmenge in 5-20 ml Aqua bidest. gelöst. Anschließend wurde zwei bis drei Stunden gegen Aqua bidest. dialysiert. Die Leitfähigkeit der dialysierten Lösung lag zwischen 7-15 µS (Aqua bidest. 3-5 µS). Das dialysierte Material wurde eingefroren, lyophilisiert und bei + 4°C aufgehoben.
Die Ausbeuten an gereinigtem, lyophilisiertem C-Phycoerythrin pro Gramm Alge (Naßgewicht) lagen zwischen 2 und 8,5 mg.

6.3. Reinheitskriterien

6.3.1. Disk-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde nach einer Methode von Maurer (1971) durchgeführt. Als Träger diente 7,7 %iges Polyacrylamid (Firma Serva), die Auftrennung erfolgte in Tris-Glycin-Puffer bei pH 8,8. Der Lauf wurde in einem Säulenelektrophoresegerät der Firma Shandon mit einem Fassungsvermögen von acht Gelröhrchen (0,6 x 8 cm) bei 4°C mit konstanter Stromstärke von 2 mA/Gelröhrchen

durchgeführt. Es wurde das Netzgerät SAE 2761 der Firma Shandon verwendet. Die durchschnittliche Laufzeit betrug 4-5 Stunden. Folgende Lösungen wurden verwendet:

1. Kammerpuffer

   6,0 g Tris, 28,8 g Glycin, 1 l Aqua dest.

Der Puffer dient als Anoden- und Kathodenpuffer und wird vor Gebrauch 1:10 verdünnt.

2. Gelpuffer

   36,6 g Tris, 0,23 ml Temed, 0,37 g Titriplex III, in 100 ml Aqua dest.

Die Lösung wird mit konzentrierter Salzsäure auf pH 8,8 eingestellt.

3. Acrylamidlösung

   30,0 g Acrylamid, 0,8 g Bisacryl, ad 100 ml Aqua dest.

4. Katalysator

   150 mg Ammoniumperoxodisulfat (Merck), 100 ml Aqua dest.

Lösung 4 muß vor Gebrauch frisch zubereitet werden.
Die Lösungen 2 und 3 wurden vor Gebrauch 5 Minuten im Vakuum entgast. Zur Herstellung der Polyacrylamidlösung wurden die Lösungen 2 bis 4 in folgendem Verhältnis miteinander gemischt (Eisbad):

Gelpuffer	5 ml
Acrylamidlösung	10 ml
H_2O	5 ml
Katalysator	20 ml

Das Gemisch wurde in die Gelröhrchen gefüllt, mit Butanol überschichtet und etwa eine Stunde bei Raumtemperatur der Polimerisation überlassen. Nach erfolgter Polimerisation wurde das Butanol entfernt und ein Vorlauf von dreißig Minuten bei einer Stromstärke von 2 mA/Gelröhrchen durchgeführt. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit etwa 10 mg Saccharose gemischt. Die Auftragsmenge betrug 100-200 µl pro Röhrchen. Als Indikator wurden zwei Tropfen einer 0,05 %igen Bromphenolblaulösung zugesetzt.

6.3.2. SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Gelelektrophorese wurde nach einer Methode von Weber und Osborn (1969) durchgeführt. Es wurden dieselben Geräte und Glasröhrchen wie bei der Disk-Gelelektrophorese verwendet.
Folgende Lösungen wurden verwendet:

1. Acrylamidlösung
   44,4 g Acrylamid, 1,2 g Bisacrylamid, Aqua dest.ad 100 ml

2. Gelpuffer/Kammerpuffer
   7,8 g NaH_2PO_4 x H_2O, 38,6 g Na_2HPO_4 x 7 H_2O, 2 g SDS in 1 l Aqua dest.

Als Kammerpuffer wird der Puffer 1:1 verdünnt.

3. Katalysator
   Ammoniumperoxodisulfat 120 mg in 10 ml Aqua dest.
   (Die Lösung ist frisch herzustellen).

Herstellung des Gels:
Acrylamidlösung 6 ml, Gelpuffer 15 ml, Ammoniumperoxodisulfat 1,5 ml, Temed 0,045 ml.
Die Anteile werden im Eisbad gemischt.
Nach erfolgter Polimerisation wird ein Vorlauf von dreißig Minuten bei 5 mA/Gelröhrchen durchgeführt.
Vor dem Auftragen werden die Proben mit Saccharose gemischt und mit wenig festem SDS versetzt. Dabei nimmt die Fluoreszenz stark ab. Die Auftragsmenge einer Phycoerythrinlösung mit einer Extinktion von 0,5-1,0 betrug 100-200 µl. Als Markerprotein wurden 1-2 Tropfen einer Cytochrom C-Lösung (5 mg/ml Gelpuffer) zugesetzt. Der Lauf wurde bei konstanter Stromstärke von 5 mA/Röhrchen bei Raumtemperatur mit Kühlung im Luftstrom durchgeführt. Die Laufzeit betrug 12-15 Stunden.
Nach dem Lauf wurden die Gele aus den Glasröhrchen herausgelöst und nach Methode 1, 2 oder 3 angefärbt.

Färbemethoden:

1. Methode

1,25 g Coomassie-Blau G-200 werden in einem Gemisch aus 460 ml 50 % Methanol und 50 ml Eisessig gelöst.

Entfärber:
875 ml H_2O, 50 ml Äthanol und 75 ml Eisessig.
Die Gele werden 12 Stunden in Coomassie-Lösung angefärbt. Anschließend wird der überschüssige Farbstoff durch Inkubation in der Entfärber-Lösung (zwei bis drei Tage) herausgewaschen.

2. Methode
0,75 g Coomassie-Blau R-250, 225 ml Methanol, 465 ml Aqua dest., 22,5 g Sulfosalicylsäure, 75 g Trichloressigsäure.
Die Gele werden 30 Minuten bei 60° angefärbt.
Entfärber:
1950 ml Aqua dest., 750 ml Äthanol, 240 ml Eisessig.

3. Methode
Die Gele werden ein bis zwei Stunden in 6 M Harnstoff pH 3,0 inkubiert.

Densitometrische Auswertung der Proteinbanden nach SDS-Gelelektrophorese
Die nach Methode 1 oder 3 angefärbten Gele wurden in einem Densitometer der Firma Vitatron (Typ TLD 100, Schreibgerät UR 400 mit Integrator) quantitativ ausgewertet. Zur Messung nach Methode 1 wurde ein Filter der Durchlässigkeit bei 609 nm, bei Anfärben nach Methode 3 ein Filter mit Durchlässigkeit bei 559 nm verwendet. Spaltblende 0,5 x 2,5 mm, Lochblende 0,25 mm. Jedes Gel wurde 3-6 mal vermessen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des angeschlossenen Integrators. Die auf Seite 10 angegebene Meßgenauigkeit ist die Standardabweichung, die bei der wiederholten Ausmessung desselben Gels gefunden wurde. Der angegebene Mittelwert des relativen Chromophorgehalts gibt den Mittelwert aus acht Aufarbeitungen mit berechneter Standardabweichung an.

6.4. Isoelektrische Fokussierung

Die Bestimmung der isoelektrischen Punkte wurde nach einer Methode von Wrighley (1968) durchgeführt. Es wurden dieselben Geräte und Gelröhrchen wie bei der Gelelektrophorese verwendet. Als Trägerampholyt wurde Servalyt (Firma Serva) pH 2-11 genommen.

Herstellung des Gels:

Acrylamidlösung	6,0 ml
Servalyt	0,6 ml
Aqua dest.	16,4 ml
Katalysatorlösung	1,2 ml

Acrylamidlösung siehe Disk-Gelelektrophorese.

Katalysatorlösung:

Riboflavin	14	mg
Temed	1	ml
Aqua dest.	ad 100	ml

Anodenpuffer: 0,2 %ige Schwefelsäure
Kathodenpuffer: 0,4 %ige Äthanolaminlösung
Das Äthanolamin wurde vor Gebrauch im Vakuum destilliert.

Auf die polimerisierten Gelröhrchen wurde eine 20 %ige Saccharoselösung mit 1 % Ampholyt aufgetragen. Die Proben wurden in einer 30-40 %igen Saccharoselösung gelöst und unter die 20 %ige Saccharoselösung unterschichtet. Bei der Fokussierung sind die Pole vertauscht, die Kathode ist unten, die Anode oben. Der Lauf wurde 30 Minuten bei 50-100 Volt und dann 2 Stunden bei 280-300 V durchgeführt. Dabei sinkt die Stromstärke auf etwa 2 mA ab.
Zur pH-Bestimmung wurden die herausgelösten Gele in 1 cm Stücke geschnitten, diese zwei-drei Tage in je 1 ml Aqua bidest. eluiert und anschließend der pH-Wert bestimmt. Aus den ermittelten Werten wurde eine Eichkurve aufgestellt, aus der die isoelektrischen Punkte der Proteinbanden abgelesen werden konnten.
Die angegebenen isoelektrischen Punkte der Untereinheiten (Tab. 3) entsprechen Mittelwerten mit Standardabweichung aus je 5 Bestimmungen.

6.5. Absorptionsspektren

Alle Absorptionsspektren wurden am Unicam 1800 SP (Firma Unicam) oder am DMR 22 (Firma Zeiss) UV-Spektralphotometer bei Raumtemperatur aufgenommen, sofern keine anderen Angaben gemacht wurden.

Bestimmung der molaren Extinktionskoeffizienten

Die Extinktionskoeffizienten wurden gravimetrisch bestimmt. Dazu wurde das gereinigte, lyophilisierte Material auf einer Analysen-Waage (ME 22, Firma Mettler, Wägegenauigkeit $\pm$ 0,6 µg) eingewogen, in einer Konzentration von 0,1 mg/ml in 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0 gelöst und die Extinktion bei 566 $\pm$ 1 nm für die α-Untereinheit, bei 557 $\pm$ 1 nm für die ß-Untereinheit und bei 558 $\pm$ 1 nm für C-Phycoerythrin bestimmt.

6.6. Präparative Isolierung der Untereinheiten

Alle im folgenden beschriebenen Harnstofflösungen wurden mit Eisessig auf pH 2,9 eingestellt.
Für die Präparierung der Untereinheiten wurde 15-20 mg gereinigtes, lyophilisiertes C-Phycoerythrin in 8 M Harnstoff pH 2,9 gelöst und 1-2 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln aufgehoben. Die Probe wurde 3 x 20 Minuten gegen 5 M Harnstoff pH 2,9 bei 4°C dialysiert und auf eine in 5 M Harnstoff pH 2,9 äquilibrierte Bio-Rex 70 Säule aufgetragen (Ø 1,5 cm, Säulenfüllung 12-15 cm; Bio-Rex: Firma Bio-Rad). Vor der Säulenfüllung war der Ionenaustauscher regeneriert worden (Vorschrift: Bio-Rad, München). Die Untereinheiten wurden mit einem linearen Gradienten von 5-8 M Harnstoff pH 2,9 eluiert. Pro Kammer wurden 100 ml Lösung verwendet. Zur Elution wurde eine Pumpe der Firma Gilson (Minipuls 2) verwendet. Die Auftrennung wurde über nacht ausgeführt, wobei die Säule zusätzlich vor Licht geschützt wurde. Das Eluat wurde in 1-1,5 ml Fraktionen gesammelt. Das Elutionsdiagramm zeigte zwei Peaks, von denen der erste die α-Untereinheit, der zweite die ß-Untereinheit enthielt. Die Untereinheiten wurden durch Gelfiltration mit bidestilliertem Wasser auf einer Biogel-P_2 Säule renaturiert (Ø 2,5 cm, Säulenfüllung 50 cm). Waren die Proben nicht vollständig entsalzt (Kontrolle durch pH-Wert und Leitfähigkeitsmessung), so wurden die Proben auf eine weitere Biogel-P_2-Säule gegeben. Nach vollständiger Entsalzung wurden die Proben

eingefroren, lyophilisiert und bei 4°C aufgehoben.

6.7. Molekulargewichtsbestimmungen

6.7.1. Gelchromatographie

Die Bestimmungen wurden mit einer Sephacryl-S-200 Säule (Sephacryl: Pharmacia; Säule 1,6 x 75 cm) bei Raumtemperatur durchgeführt. Eine Eichkurve wurde mit folgenden Proteinen ermittelt: Katalase, Aldolase, Rinderserumalbumin, Ovalbumin, Chymotrypsinogen (5 mg/ml), Dextran Blau und Cytochrom C (2 mg/ml). Die Molekulargewichte sind bei Andrews (1965) angegeben. Eluiert wurde mit folgendem Puffer: Tris-HCl Puffer, Ionenstärke 0,1, 0,5 M NaCl, pH 7,6 bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 6 ml/h. Das Eluat wurde in Fraktionen von 1,8 ml aufgefangen. Die Auftragsmenge betrug 1 ml, sofern in Tab. 5 nichts anderes angegeben wurde.

6.7.2. Analytische Ultrazentrifugation

Die Bestimmungen wurden mit einer analytischen Ultrazentrifuge der Firma Beckman (Typ E), die mit einer Scanner Optik ausgestattet ist, durchgeführt. Die Extinktion wurde bei 280 nm gemessen. Sofern nichts anderes angegeben ist, wurden alle Läufe bei 20°C mit einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 56 000 UpM in 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0 durchgeführt. Die ermittelten Sedimentationskoeffizienten wurden auf Standardbedingungen umgerechnet. Die partiellen spezifischen Volumina der Proteine wurden aus der Aminosäureanalyse (Muckle 1978) nach einer Methode von Cohn und Edsall (1943) berechnet. C-PE: V^* 0,730, ß-Untereinheit: V^* 0,730, α-Untereinheit: V^* 0,730. Da keine signifikante Konzentrationsabhängigkeit des Sedimentationskoeffizienten für C-Phycoerythrin in einem Konzentrationsbereich von 0,20 x 10^{-5} Mol/l bis 0,58 x 10^{-5} Mol/l gefunden wurde, wurde keine Korrektur zur Bestimmung der s_o-Werte durchgeführt (siehe Formel 2.5, S.26).

Die Sedimentationsgleichgewichtsanalyse wurde nach Yphantis (1964) durchgeführt. Dabei wurden folgende Versuchsbedingungen gewählt: 24 000 Upm, 24 Stunden bei einer Proteinkonzentration von 0,3 mg/ml, 8000 Upm, 41 Stunden bei einer Proteinkonzentration von 1,5 mg/ml.

Zur Umrechnung auf Standardbedingungen mußten die Dichte und die Viskosität der verwendeten Pufferlösungen bei der entsprechenden Temperatur ermittelt werden. Die Viskositätsbestimmungen wurden in einem temperierten Kapillarviskosimeter nach Ubbelohde (Nr. 450 94) durchgeführt (Thermostat: Firma Haake), die Dichte in einem temperierten Dichtemesser nach Krattky (Digitaler Dichtemesser DMA 02C, Firma Heraeus/Paar) bestimmt. In Tabelle 13 sind die Ergebnisse zusammengestellt. Die verwendeten Pufferlösungen mit einer Ionenstärke von 0,1 (Tab. 13, 1-15) wurden nach einer Vorschrift von Long (1961) hergestellt.
Zur Ermittlung der genauen Temperatureinstellung wurde der verwendete ANH-Rotor über einen Temperaturbereich von 5°-40°C geeicht.
Eine Korrektur des partiellen spezifischen Volumens zur Berechnung des Sedimentationskoeffizienten bei Proteindenaturierung (Temperatur, pH-Wert, Harnstoff) wurde nicht vorgenommen, da aus Literaturdaten hervorgeht, daß die Abweichungen nur wenige Prozent des bei 20°C unter normalen Bedingungen ermittelten Wertes betragen (Temperatur: Elias 1964, Harnstoff: Lapanje 1976, S.105, Abweichung bei pH 10,0: nur wenige Prozent, persönl. Mitteilung Dr. Prieß, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried).

Tabelle 13: Viskosität und Dichte der verwendeten Pufferlösungen

Nr.	Puffer	pH	°C	Dichte (g/ml)	Viskosität c.St.
1.	Acetat-P.	5,81	20	1,0025	1,06743
2.	K-Na-Phosp.	6,61	20	1,0065	1,03868
3.	Tris-HCl	6,94	20	1,0024	1,04314
4.	Tris-HCl	7,41	20	1,0047	1,04404
5.	Tris-HCl	7,90	20	1,0057	1,05156
6.	Tris-HCl	8,56	20	1,0122	1,13162
7.	Glycin-NaOH	9,00	20	1,0199	1,11120
8.	Glycin-NaOH	9,26	20	1,0143	1,08615
9.	Glycin-NaOH	9,40	20	1,0105	1,07065
10.	Glycin-NaOH	9,60	20	1,0078	1,05662
11.	Glycin-NaOH	9,87	20	1,0068	1,04781
12.	Glycin-NaOH	10,08	20	1,0052	1,04215
13.	Glycin-NaOH	10,27	20	1,0048	1,03831
14.	Glycin-NaOH	10,47	20	1,0043	1,03456
15.	Glycin-NaOH	10,62	20	1,0034	1,03298
16.	0,1 M Na-Phos.	7,00	20	1,0127	1,04983
17.	0,1 M Na-Phos.	6,94	5	1,0146	1,49120
18.	0,1 M Na-Phos.	7,03	40	1,0060	0,69170
19.	4 M Harnstoff in Tris-HCl, I = 0,1	7,04	20	1,0662	1,16865
20.	Tris-HCl + 0,5 M NaCl	7,60	20	1,0082	1,06371

6.8. Fluoreszenzmessungen

6.8.1. Fluoreszenzspektren

Fluoreszenzemissions- und erregerspektren wurden am DMR 22 mit einer serienmäßigen Fluoreszenzzusatzeinrichtung (ZMF 4) aufgenommen. Als Lichtquelle diente eine Xenon-Hochdrucklampe (LX 501-XBO 450 W) mit einem zweiten Monochromator (M4Q III). Die Fluoreszenz wurde im rechten Winkel zur Anregungsrichtung beobachtet.
Zur Bestimmung der absoluten Fluoreszenzquantenausbeute wurde Rhodamin B in Äthanol als Standard verwendet (Ø = 0,94 $\pm$ 6,5 %, Dale, Teale 1970). Da Rhodamin B im gleichen Spektralbereich und mit sehr ähnlichem Emissionsspektrum (Weber, Bass 1969) emittiert wie C-Phycoerythrin bzw. die α- und ß-Untereinheit, wurden die Emissionsspektren nicht korrigiert in bezug auf die spektrale Empfindlichkeit des Empfängersystems.
Da bei höheren Konzentrationen Reabsorptionseffekte auftreten, wurde der lineare Bereich mittels einer Eichkurve bestimmt. Für Rhodamin B und für C-Phycoerythrin wurde ein Extinktionsbereich von 0,02 bis 0,25 (E bei 535 nm) untersucht. Eine Linearität war bei beiden Substanzen bis zu einer Extinktion von 0,12 gegeben. Zur Bestimmung der Quantenausbeute wurden Lösungen verwendet mit einer Extinktion von 0,05 bis 0,1 bei der Anregungswellenlänge.

6.8.2. Polarisationsgradspektren

Die Polarisationsgradspektren wurden mit einer selbstgebauten Polarisationsgrad-Apparatur (Werkstatt der Physikalischen Chemie II, Technische Universität München) aufgenommen. Als Lichtquelle diente eine Xenon-Hochdrucklampe XBO 450 W (Osram). Außerdem wurden zwei Monochromatoren der Firma Zeiss verwendet (M4Q III und MM 12). Die Meßmethode wurde von Dörr (1971) entwickelt, der Aufbau der Apparatur ist bei Friedrich (1975) beschrieben. Zur Aufnahme der Polarisationsgradspektren im eingefrorenen Zustand wurde mit flüssigem Stickstoff gekühlt (SEV-Kryostat, Firma Lauda TK 30 D).

Korrigierte Fluoreszenzemissionsspektren, die zur Beurteilung der Spiegelsymmetrie und für die Entfaltungsprozedur der Absorptionsspektren (siehe Abb. 20, 21, 23) benötigt wurden, wurden mit der oben beschriebenen Polarisationsgrad-Apparatur aufgenommen. Die Korrektur wurde mit einer Tungsten Lampe (Osram) durchgeführt, deren Emission in der Literatur beschrieben ist (Rutgers 1958). Die Genauigkeit beträgt $\pm$ 10 %.

6.8.3. Tieftemperaturspektren

Zur Aufnahme der Fluoreszenzerreger- und emissionsspektren bei 4° K wurden die Lösungen in Quartzröhrchen mit einem Innendurchmesser von 1 mm gefüllt, diese abgeschmolzen und in einen Kombi-Kryostaten (Firma Leybold, Temperaturbereich 1,3 K bis 300 K) gestellt. Als Erregerquelle wurde eine Xenon-Hochdrucklampe zusammen mit einem Zeiss Doppelmonochromator (MM 12) verwendet (Bandbreite 120 cm^{-1}, Anregungswellenlänge 520 nm). Die Fluoreszenz wurde mit einem Gittermonochromator (Chromatix CT 103) in linearer Anordnung detektiert. Das Signal wurde mit einem Photomultiplier (Hamamatsu R 649) verstärkt, in einen Photonenzähler eingegeben (Ortec 5 C 1) und auf einen XY-Schreiber übertragen. Zum Herausfiltern des Anregungslichtes wurde ein ORG-Filter der Firma Schott verwendet. Die verwendeten Bandbreiten sind in den Abbildungen eingezeichnet.

Zur Aufnahme der Tieftemperaturspektren wurden die Substanzen in einem Gemisch aus 0,1 M Natriumphosphatpuffer und Glycerin (Vakuum destilliert) im Verhältnis 1:2 gelöst. In diesem Lösungsmittel bleiben die Absorptionsspektren des C-Phycoerythrins und der Untereinheiten bis auf eine geringe Linienverschmälerung und eine Rotverschiebung des Maximums um 1-2 nm, unverändert, ebenso die Quantenausbeute.

Die Proteinkonzentrationen der untersuchten Lösungen lagen zwischen 3×10^{-6} und 2×10^{-7} Mol/l beim C-Phycoerythrin und zwischen 7×10^{-6} bis 2×10^{-7} Mol/l bei den Untereinheiten. Die Konzentrationen wurden mit Hilfe der Extinktionskoeffizienten berechnet.

6.9. Proteindenaturierung

6.9.1. Denaturierung durch pH-Änderung

Zur Denaturierung wurden die in Tab. 13, Nr. 1-15 angegebenen Puffer mit konstanter Ionenstärke von 0,1 verwendet. Zur Aufnahme der Spektren wurde eine konzentrierte Proteinlösung in Aqua bidest. hergestellt und diese 1:10 mit dem entsprechenden Puffer verdünnt.

6.9.2. Denaturierung mit Harnstoff

Die Harnstofflösungen wurden in 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0 bzw. in Tris-HCl Puffer pH 7,0, I = 0,1 hergestellt. Es wurde wiederum eine konzentrierte Proteinlösung im entsprechenden Puffer hergestellt und mit den Harnstofflösungen auf die angegebene Molarität verdünnt. Die Spektren wurden nach 5 und nach 90 Minuten aufgenommen. In der Zwischenzeit wurden die Lösungen im Dunkeln aufbewahrt, um ein Ausbleichen zu verhindern.

6.9.3. Denaturierung durch Temperaturerhöhung

Zur Aufnahme der Absorptions- und Fluoreszenzspektren wurde der Puffer im Küvettenhalter vortemperiert. Nach Erreichen der entsprechenden Temperatur wurde ein Aliquot einer konzentrierten C-Phycoerythrinlösung dazupipettiert, die Lösungen gemischt und die Spektren nach 1, 5 und nach 15 Minuten aufgenommen. Es wurde 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0 verwendet.

6.10. Oxidationsreaktionen

6.10.1. mit Jodlösung

Zur Reaktion wurde eine $2{,}5 \times 10^{-3}$ M Jodlösung verwendet. C-Phycoerythrinlösungen einer Konzentration von 1 bis 2×10^{-6} Mol/l wurden in einem Verhältnis von 30:1 bis 10:1 mit der angegebenen Jodlösung versetzt. Die Reaktion wurde bei pH 7,0 mit und ohne Harnstoff und bei pH 3,0 in 6 M Harnstoff durchgeführt. Außerdem wurde mit Weißlicht belichtet oder auf 50° bis 60° C erwärmt. Die Belichtung wurde mit einer Projektorlampe im Abstand von 20 cm durchgeführt.

6.10.2. mit Cer-IV-sulfat

Die Reaktion wurde bei einer Konzentration von 10^{-3} und 10^{-4} M Cer-IV-sulfat durchgeführt. Zur Durchführung der Reaktionen siehe 10.1.

6.10.3. mit Kaliumhexacyanoferrat-III

Die Konzentration des Oxidationsmittels war 10^{-3} bzw. 10^{-4} molar. Die Proteinkonzentrationen lagen zwischen 1 und 4,7 x 10^{-6} Mol/l. Der Überschuß des Oxidationsmittels wurde nach beendeter Reaktion mit 0,1 M Cysteinlösung (pH 7,0) entfärbt.

6.10.4. mit Benzochinon

Es wurde eine kaltgesättigte Benzochinonlösung verwendet. Die Proteinkonzentrationen lagen bei 1 bis 2 x 10^{-6} Mol/l. Die Reaktion wurde in 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0 durchgeführt. Die Benzochinonlösung wurde in Konzentrationen von 1:10 bis 3,3:10 verwendet. Belichtungsreaktion siehe 10.1.

6.11. Trypsinabbau von oxidiertem C-Phycoerythrin

Die Proteinkonzentration war 4,7 x 10^{-6} molar, die Konzentration des Oxidationsmittels war 10^{-3} M. Die Oxidation wurde wie unter 4.5.1. beschrieben, durchgeführt. Nach beendeter Reaktion wurde überschüssiges Kaliumhexacyanoferrat-(III) durch Zugabe von Cysteinlösung entfärbt.
Anschließend wurde über Biogel-P_2 entsalzt. Der Trypsinabbau wurde 2 h bei 37°C, pH 7,8 anaerob durchgeführt (Muckle 1978). Die gleiche Versuchsanordnung galt auch in 3,5 M Harnstoff bei pH 7,0 (ohne Erwärmen). Zur Identifizierung der Chromopeptide wurde eine isoelektrische Fokussierung bei pH 2-11 durchgeführt.

Literaturverzeichnis

Andrews, P. (1965): The gel-filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range. Biochem.J. 96, 595

Baldwin, R.L. (1975): Intermediates in protein folding reactions and the mechanism of protein folding. Adv.Enzymol. 43, 453

Barber, D.J. und J.T. Richards (1977): Energy transfer in the accessory pigments R-phycoerythrin and C-phycocyanin. Photochem.Photobiol. 25, 565

Becker, R.S. (1969): Theorie and interpretation of fluorescence and phosphorescence, Herausgeber: John Wiley & Sons, New York, London, Sydney, Toronto

Bennett, A. und L. Bogorad (1971): Properties of subunits and aggregates of blue-green algal biliproteins. Biochemistry 10, 3625

Bennett, A. und L. Bogorad (1973): Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. J.Cell.Biol. 58, 419

Bogorad, L. (1975): Phycobiliproteins and complementary chromatic adaptation. Ann.Rev.Plant Physiol. 26, 369

Bois-Choussy, M. und M. Barbier (1977): Structure de la sarpédobiline, pigment biliaire de lépidoptère. Experientia 33, 1407

Bois-Choussy, M. und M. Barbier (1978): Isomerisations and cyclisations in bile pigments. Heterocycles 9, 677

Bonfiglio, J.V., R. Bonnett, M.B. Hursthouse, K.M.A. Malik und S.C. Naithani (1977): Electrophilic substitution in verdins: deuteration and nitration of 2,3,7,8,12,13,17,18-octaethylbilin- 1,19 (21 H, 24 H)-dione (octaethylbilatriene-abc): X-ray crystal structure of the 5-nitro-derivative. J.Chem.Soc.Chem.Comm., 829

Bryant, D.A., A.N. Glazer und F.A. Eiserling (1976): Characterization and structural properties of the major biliproteins of Anabaena sp. Arch.Microbiol. 110, 61

Bryant, D.A., C.S. Hixson und A.N. Glazer (1978): Structural studies on phycobiliproteins III. J.Biol.Chem. 253, 220

Burke, H.J., D.C. Pratt und A. Moscowitz (1972): Low-temperature absorption and circular dichroism studies of phytochrome. Biochem. 11, 4025

Chae, Q. und P.S. Song (1975): Linear dichroic spectra and fluorescence polarization of biliverdin. J.Am.Chem.Soc. 97, 4176

Chan, W.W.C. und H.M. Mawer (1972): Studies on protein subunits. II. Preparation and properties of active subunits of aldolase bound to a matrix. Arch.Biochem.Biophys. 149, 136

Chapman, D.J. (1973): Biliproteins and bile pigments. S. 162-185. In: The biology of blue-green algae, Herausgeber: N.B. Carr und B.A. Whitton, Blackwall Scientific Publications

Chen, Ch.-H., O.H.W. Kao und D.S. Berns (1977): Denaturation of phycocyanin by urea and determination of the enthalpy of denaturation by microcalorimetry. Biophys.Chem. 7, 81

Choussy, M. und M. Barbier (1975): Pterobiline et neopterobilines, reactivités et structures. Helvetia Chim. Acta 58, 2651

Chrambach, A., R.A. Reisfeld, M. Wyckoff und J. Zaccari (1967): A procedure for rapid and sensitive staining of protein fractionated by polyacrylamide gel electrophoresis. Anal.Biochem. 20, 150

Cohen-Bazire, G.S., S. Béguin, S. Rimon, A.N. Glazer und D.M. Brown (1977): Physico-chemical and immunological properties of allophycocyanins. Arch.Microbiol. 111, 225

Cohn, E.J. und J.T. Edsall (1943) In: Proteins, amino acids and peptides, S. 370. Verlag Reinhold, New York

Csatorday, K. (1978): Fluorescence from sensitizing phycobilin chromophores in the blue-green alga Anacystis nidulans. Biochim.Biophys.Acta 504, 341

Csatorday, K., J.W. Kleinen Hammans und J.C. Goedheer (1978): Excitation energy transfer in Anacystis nidulans. Biochem.Biophys.Res.Comm. 81, 571

Dale, R.E. und F.W.J. Teale (1970): Number and distribution of chromophortypes in native phycobiliproteins. Photochem. Photobiol. 12, 99

Dehler, J. und F. Dörr (1965): Apparatur zur Registrierung von Polarisationsgradspektren. Zeitschr.Angew.Physik 19, 147

Dörr, F. (1966): Zur Spektroskopie mit polarisiertem Licht. Zeitschr.Angew.Chem. 78, 457

Dörr, F. (1971): In: Creation and detection of the excited state, Vol. 1A, S. 53, Herausgeber: M. Dekker, New York

Dörr, F. (1977): Allgemeine Grundlagen der Photophysik und Photochemie. In: Biophysik, S. 174 ff, Herausgeber: W. Hoppe, W. Lohmann, H. Markl und H. Ziegler, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

Duysens, L.N.M. (1951): Transfer of light energy within pigment systems present in photosynthesizing cells. Nature 168, 548

Elias, H.-G. (1961). Ultrazentrifugen-Methoden, S. 116 ff, Herausgeber: Beckman Instruments GmbH, München

Eriksson-Quensel, I. (1938): The molecular weights of phycoerythrin and phycocyanin. Biochem.J. 32, 585

Erokhina, L.G. und A.A. Krasnovski (1968): Effects of denaturing agents on absorption and fluorescence spectra of phycoerythrin from Callithamnion rubosum. Mol.Biol. 2, 550

Falk, H., K. Grubmayr und F. Neufingerl (1977 a): Zur photochemischen (Z) $\rightleftharpoons$ (E)-Isomerisierung von Gallenpigment-Partialstrukturen. Monatshefte Chemie 108, 1185

Falk, H., St. Gergely, K. Grubmayr und O. Hofer (1977 b): Beiträge zur Chemie der Pyrrolpigmente XVII. Struktur- und konformationsanalytische Untersuchungen am chromophoren System der Bilivioline [Biladiene-a,b]. Z.Naturforschung 32b, 299

Falk, H. und K.Grubmayr (1977 c): Ein geometrisch isomeres Bilatrien-abc. Angew.Chem. 89, 487

Falk, H., K. Grubmayr, E. Haslinger, T. Schlederer und K. Thirring (1978): Beiträge zur Chemie der Pyrrolpigmente. 25. Mitt. Die diastereomeren (geometrisch isomeren) Biliverdindimethylester-Struktur, Konfiguration und Konformation. Monatshefte Chemie 109, 1451

Förster, Th. (1951): Fluoreszenz organischer Verbindungen, Vandenhoek und Ruprecht, Göttingen

Frank, G., W. Sidler, H. Widmer und H. Zuber (1978): The complete amino acid sequence of both subunits of C-phycocyanin from the cyanobacterium Mastigocladus laminosus. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 359, 1491

Freidenreich, P., G.S. Apell und A.N. Glazer (1978): Structural studies on phycobiliproteins. II. J.Biol.Chem. 253, 212

French, C.S. und V.K. Young (1952): The fluorescence spectra of red algae and the transfer of energy from phycoerythrin to phycocyanin and chlorophyll. J.Gen.Physiol. 35, 873

Friedrich, J., F. Metz und F. Dörr (1975): What is the influence of a 'heavy atom' on the decay mechanisms of the lowest triplet state of aromatic hydrocarbons. Mol.Phys. 30, 289

Fujimori, E. und J. Pecci (1966): Dissociation and association of phycocyanin. Biochemistry 5, 3500

Fujimori, E. und J. Pecci (1970): pH-dependent association of the phycoerythrin subunit. Biochim.Biophys.Acta 207, 259

Gantt, E., M.R. Edwards and L. Provasoli (1971): Chloroplast structure of the Cryptophyceae. Evident for phycobiliproteins within intrathylakoidal spaces. J.Cell Biol. 48, 280

Gantt, E. und C.A. Lipschultz (1972): Phycobilisomes of Porphyridium cruentum. I. Isolation. J.Cell Biol. 54, 313

Gantt, E. und C.A. Lipschultz (1974): Phycobilisomes of Porphyridium cruentum: pigment analysis. Biochemistry 13, 2960

Gantt, E. (1975): Phycobilisomes: light-harvesting pigment complexes. BioScience 25, 781

Glazer, A.N. und G. Cohen-Bazire (1971): Subunit structure of the phycobiliproteins of blue-green algae. Proc.Nat.Acad. Sci.USA 68, 1398

Glazer, A.N. und S. Fang (1973 a): Formation of hybrid proteins from the α- and ß-subunits of phycocyanins. J.Biol.Chem. 248, 659

Glazer, A.N. und S. Fang (1973 b): Chromophor-content of blue-green algae phycobiliproteins. J.Biol.Chem. 248, 663

Glazer, A.N., S. Fang and D.M. Brown (1973): Spectroscopic properties of C-phycocyanin and of its α- and ß-subunits. J.Biol.Chem. 248, 5679

Glazer, A.N. und C.S. Hixson (1975): Characterization of R-phycocyanin. J.Biol.Chem. 250, 5487

Glazer, A.N., G.S. Apell, C.S. Hixson, D.A. Bryant, S. Rimon und D.M. Brown (1976): Biliproteins of cyanobacteria and rhodophyta: a homologous family of photosynthetic accessory pigments. Proc.Nat.Acad.Sci.USA 73, 428

Glazer, A.N. (1976): Phycocyanins: structure and function. Photochem.Photobiol.Rev. Vol. 1, 71, Plenum Press, New York

Glazer, A.N. (1977): Structure and molecular organization of the photosynthetic accessory pigments of cyanobacteria and red algae. Mol.Cell.Biochem. 18, 125

Glazer, A.N. und C.S. Hixson (1977): Subunit structure and chromophore composition of rhodophytan phycoerythrins. J.Biol.Chem. 252, 32

Glazer, A.N., C.S. Hixson und R.J. Delange (1979): Determination of the number of thioether linked cysteine residues in cytochromes C and phycobiliproteins. Anal.Biochem. 92, 489

Goedheer, J.C. (1965): Fluorescence action spectra of algae and bean leaves at room and at liquid nitrogen temperatures. Biochim.Biophys.Acta 102, 73

Goedheer, J.C. und F. Birnie (1965): Fluorescence polarisation and location of fluorescence maxima of C-phycocyanin. Biochim.Biophys.Acta 94, 579

Grabowski, J. und E. Gantt (1978 a): Photophysical properties of phycobiliproteins from phycobilisomes: fluorescence lifetimes, quantum yields, and polarization spectra. Photochem.Photobiol. 28, 39

Grabowski, J. und E. Gantt (1978 b): Excitation energy migration in phycobilisomes: comparison of experimental results and theoretical predictions. Photochem.Photobiol. 28, 47

Gray, B.H., C.A. Lipschultz und E. Gantt (1973): Phycobilisomes from a blue-green alga Nostoc species. J.Bacteriol. 116, 471

Gray, B.H. und E. Gantt (1975): Spectral properties of phycobilisomes and phycobiliproteins from the blue-green alga Nostoc sp. Photochem.Photobiol. 21, 121

Gysi, J. und H. Zuber (1974): Isolation and characterization of allophycocyanin II from the thermophilic blue-green alga Mastigocladus laminosus Cohn. FEBS Lett. 48, 209

Haber, E. und C.B. Anfinsen (1962): Side-chain interactions govering the pairing of half-cystine residues in ribonuclease. J.Biol.Chem. 237, 1839

Hattori, A. und Y. Fujita (1959): Crystalline phycobilin chromoproteins obtained from a blue-green alga, Tolypothrix tenuis. J.Biochem. 46, 633

Haxo, F.T. und L.R.Blinks (1950): Photosynthetic action spectra of marine algae. J.Gen.Physiol. 33, 389

Hechenbichler, F.J. (1974): Untersuchungen über die Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenzpolarisation einiger Enzyme in wässriger Lösung mit Hilfe einer verbesserten Polarisationsgrad-Apparatur. Dissertation Technische Universität München

Jablonski, A. (1955): Self-depolarization and decay of photoluminescence of solutions. Acta Physica Pol. 14, 295

Jaenicke, R. (1971): Volume changes in the isoelectric heat aggregation of serum albumin. Eur.J.Biochem. 21, 110

Kao, O., D.S. Berns und R. MacColl (1971): C-phycocyanin monomer molecular weight. Eur.J.Biochem. 19, 595

Kao, O. und D.S. Berns (1977): Similar C-phycocyanins from two strains of thermotolerant cyanophyte Mastigocladus laminosus. Can.J.Microbiol. 23, 510

Köst, H.-P. (1974): Strukturuntersuchungen an den Phycobiliproteiden B-Phycoerythrin aus Porphyridium cruentum und C-Phycocyanin aus Anacystis nidulans. Dissertation Universität München

Köst, H.-P. und W. Rüdiger (1977): Phycobilins. In: Chemistry and physiology of bile pigments, S. 518, Herausgeber: P.D.Berk und N.I.Berlin

Köst, H.-P., W. Rüdiger und D.J. Chapman (1975): Über die Bindungen zwischen Chromophor und Protein in Biliproteiden. I. Abbauversuche und Spektraluntersuchungen. Liebigs Ann.Chem. 1975, 1582

Koller, K.-P., W. Wehrmeyer und E. Mörschel (1978): Biliprotein assembly in the disc-shaped phycobilisomes of Rhodella violacea. Eur.J.Biochem. 91, 57

Knox, R.S. (1968): Theorie of polarization quenching by excitation transfer. Physica 39, 361

Krauss, C., persönl. Mitteilung, Dissertation in Vorbereitung, Universität München

Kuhn, H. (1977): Energieübertragungsmechanismen. In: Biophysik, S. 187 ff, Herausgeber: W. Hoppe, W. Lohmann, H. Markl und H. Ziegler, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

Lapanje, S. (1976): Physicochemical aspects of protein denaturation. Herausgeber: John Wiley & Sons, New York

Lin, S.H. (1971): Isotope effect, energy gap law and temperature effect in resonance energy transfer. Mol.Physics 21, 853

Long, C. (1961): In: Biochemist's Handbook, Herausgeber: E. und F.N. Spon, London

MacColl, R., D.S. Berns und N.L. Koven (1971): Effect of salts on C-phycocyanin. Arch.Biochem.Biophys. 146, 477

MacColl, R., J.J. Lee und D.S. Berns (1971): Protein aggregation in C-phycocyanin. Biochem.J. 122, 421

MacColl, R., D.S. Berns und O. Gibbons (1976): Characterization of cryptomonad phycoerythrin and phycocyanin. Arch.Biochem. Biophys. 177, 265

MacColl, R. und D.S. Berns (1978): Energy transfer studies on cryptomonad biliproteins. Photochem.Photobiol. 27, 343

MacColl, R., M.R. Edwards und C. Haaksma (1978): Some properties of allophycocyanin from a thermophilic blue-green alga. Biophys.Chem. 8, 369

Macdowall, F.D.H., T. Bednar und A. Rosenberg (1968): Conformation dependence of intramolecular energy transfer in phycoerythrin. Proc.Nat.Acad.Sci.USA 59, 1356

Mörschel, E. und W. Wehrmeyer (1975): Cryptomonad biliprotein: phycocyanin 645 from a Chroomonas species. Arch.Microbiol. 105, 153

Maurer, H.R. (1971):In: Disc-Gelelectrophoresis, Walter de Gruyter, Berlin, New York

Muckle, G. und W. Rüdiger (1977): Chromophore content of C-phycoerythrin from various cyanobacteria. Z.Naturforschg. 32c, 957

Muckle, G. (1978): Vergleichende Untersuchungen von C-Phycoerythrinen aus verschiedenen Cyanobakterien unter besonderer Berücksichtigung der Chromophorregionen. Dissertation Universität München

Muckle, G., J. Otto und W. Rüdiger (1978): On the linkages between chromophore and protein in biliproteins. VII: amino acid sequence in the chromophore regions of C-phycoerythrin from Pseudanabaena W 1173 and Phormidium persicinum. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 359, 345

Murphy, G. und P.O'Carra (1970): Reversible denaturation of C-phycocyanin. Biochim.Biophys.Acta 214, 371

Nultsch, W. (1962): Trennung von Chromoproteiden durch Gelfiltration. Biochim.Biophys.Acta 59, 213

O'Carra, P. (1965): Purification and N-terminal analysis of algal biliproteins. Biochem.J. 94, 171

O'Carra, P. und C.O'hEocha (1976): Algal biliproteins and phycobilins, S. 328, In: Chemistry and biochemistry of plant pigments, Herausgeber: T.W. Goodwin, Vol. 1, Academic Press, London, New York, San Francisco

O'hEocha, C. und F.T. Haxo (1960): Some atypical algal chromoproteins. Biochem.Biophys.Acta 41, 516

O'hEocha und P.O'Carra (1961): Spectral studies of denatured phycoerythrins. J.Amer.Chem.Soc. 89, 1091

Pecci, E. und J. Fujimori (1968): Spectral change of phycoerythrin from hydrocoleum species and its relationship to protein dissociation. Biochim.Biophys.Acta 154, 332

Perrin, F. (1929): La fluorescence des solutions. Induction moléculaire. - Polarisation et durée d'emission. - Photochimie. Ann.Physique 12, 169

Porter, G., C.J. Tredwell, G.F.W. Searle und T. Barber (1978): Picosecond time-resolved energy transfer in Porphyridium cruentum. Part I. In the intact alga. Biochim.Biophys.Acta 501, 232

Prieß, H., persönl. Mitteilung, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried

Rüdiger, W. (1968, 1): Vergleichende Chemie der Gallenfarbstoffe, Habilitationsschrift, Universität Saarbrücken

Rüdiger, W. (1968, 2): A new degradation technique and its application. In: Porphyrins and related compounds. Herausgeber: T.W. Goodwin, Academic Press, London

Rüdiger, W. und P. O'Carra (1969 a): Studies on the structures and apoprotein linkages of the phycobilins. Eur.J.Biochem. 7, 509

Rüdiger, W. (1969 b): Chromsäure und Chromatabbau von Gallenfarbstoffen. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 350, 1291

Rüdiger, W. (1971): In: Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe 29, S. 60 ff. Herausgeber: W. Herz, H. Grisebach und G.W. Kirby, Springer Verlag, Wien, New York.

Rüdiger, W. (1975): Phycobiliproteide. Ber.Deutsch.Bot.Ges. 88, 125

Rutgers, G.A.W. (1958): In: Handbuch der Physik. Vol. 26, S. 129, Springer Verlag, Heidelberg

Scheer, H. und W. Kufer (1977): Conformational studies on C-phycocyanin from Spirulina platensis. Z.Natuforschg. 32c, 513

Scheer, H. (1976): Studies on plant bile pigments: characterization of a model for the phytochrome Pr chromophor. Z.Naturforschg. 31c, 413

Scheer, H. (1978): Biliproteins, the chromophore, S. 25-52, in: Plant growth and light perception, Herausgeber: B. Deutch, B.I. Deutch, A.V. Gyldenholm, University of Aarhus.

Schoch, S., G. Klein, U. Linsenmeier und W. Rüdiger (1976 a): Über die Bindungen zwischen Chromophor und Protein in Biliproteiden. Liebigs Ann.Chem.,549

Schoch, S. und W. Rüdiger (1976 b): Über die Bindungen zwischen Chromophor und Protein in Biliproteiden. Liebigs Ann.Chem.,559

Scott, E. und D.S. Berns (1965): Protein-protein interaction. The phycocyanin system. Biochemistry 4, 2597

Searle, G.F.W., J. Barber, G. Porter und C.J. Tredwell (1978): Picosecond time-resolved energy transfer in Porphyridium cruentum. Part II. In isolated phycobilisomes. Biocheim.Biophys. Acta 501, 246

Sheldrick, W.S., A. Borkenstein, J. Engel und G. Struckmeier (1978): Ein Bilatrien-a,b,c mit anti-Z, syn-Z, syn-Z-Konfiguration. Kristall- und Molekülstruktur von 1,19-Diäthoxycarbonyloctamethylbilatrien-a,b,c. J.Chem.Res. 4, 1616

Song, P.S. und Mitarbeiter (1979) in Vorbereitung

Sugimoto, T., M. Oishi und H. Suzuki (1977): On the models for phytochrome chromophore. IV. J.Phys.Soc.Jap. 43, 619

Svedberg, T. und T. Katsurai (1929): The molecular weights of phycocyanin and of phycoerythrin from Porphyra tenera and of phycocyanin from Aphanizomenon. J.Am.Chem.Soc. 51, 3573

Takemoto, J. und L. Bogorad (1975): Subunits of phycoerythrin from Fremyella diplosiphon: chemical and immunochemical characterization. Biochemistry 14, 1211

Tanaka, S. und H.A. Scheraga (1975): Model of protein folding: inclusion of short-, medium, and longrange interactions. Proc.Nat.Acad.Sci.USA 72, 3802

Tandeau de Marsac, N. und G. Cohen-Bazire (1977): Molecular composition of cyanobacterial phycobilisomes. Proc.Nat.Acad. Sci. USA 74, 1635

Teale, F.W.J. und R.E. Dale (1970): Isolation and spectral characterization of phycobiliproteins. Biochem.J. 116, 161

Tomita, G. und E. Rabinowitch (1962): Excitation energy transfer between pigments in photosynthetic cells. Biophys.J. 2, 483

Troxler, R.F. und L. Bogorad (1966): Studies on the formation of phycocyanin, porphyrins and a blue phycobilin by wild-type and mutant strains of Cyanidium caldarium. Plant Physiol. 41, 491

Troxler, R.F. und J.M.Dokos (1973): Formation of carbon monoxide and bile pigment in red and blue-green algae. Plant Physiol. 51, 72

Troxler, R.F. und A.S. Brown (1975): Metabolism of δ-amino-levulinic acid in red and blue-green algae. Plant Physiol. 55, 463

Troxler, R.F., J.A. Foster, A.S. Brown und C. Franzblau (1975): The α and ß-subunits of Cyanidium caldarium phycocyanin: properties and amino acid sequences of the amino terminal regions. Biochemistry 14, 268

Vernotte, C. (1971): Separation et caracterisation spectroscopique du monomere et des polymeres de la C-phycocyanine. Photochem.Photobiol. 14, 163

Vernotte, C. und I. Moya (1973): Action de la temperature sur la duree de vie de fluorescence et le rendement de fluorescence de la C-phycocyanine en solution. Photochem.Photobiol. 17, 245

Wagenmann, R. (1977): Untersuchungen von Phycoerythrin und Phycocyanin aus Pseudanabaena W 1173 im Vergleich mit anderen Cyanobakterien. Dissertation Universität München

Wagnière, G. und G. Blauer (1976): Calculations of optical properties of biliverdin in various conformations. J.Am.Chem.Soc. 93, 7806

Weber, G. (1952): Polarization of the fluorescence of macromolecules. Biochem.J. 51, 145

Weber, G. (1954): Dependence of the polarization of the fluorescence on the concentration. Trans Faraday Soc. 50, 552

Weber, M.J. und M. Bass (1969): Frequency- and time-dependent gain acharacteristics of dye lasers.J.Quant.Electronics, Vol. QE-5, Nr. 4, S. 175

Weber, K. und M. Osborn (1969): The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J.Biol.Chem. 244, 4406

Williams, V.P. and A.N. Glazer (1978): Structural studies on phycobiliproteins. I. J.Biol.Chem. 253, 202

Wrighley, C. (1968): Gel electrofocusing - a technique for analyzing multiple protein samples by isoelectric focusing. Science Tools 15, 17

Yamanaka, G., A.N. Glazer and R.C. Williams (1978): Cyanobacterial phycobilisomes. J.Biol.Chem. 253, 8303

Yon, J.M. (1978): Some aspects of protein folding. Biochémie 60, 581

Yphantis, D.A. (1964): Equilibrium ultracentrifugation of dilute solutions. Biochemistry 3, 297

Lebenslauf

6.7.1950	geboren in Bevensen (Niedersachsen) als Tochter der beiden Fachärzte für Allgemeinmedizin Dr.med. Werner Koch und seiner Ehefrau Maria, geb. Gaidzik. Wohnort: Bienenbüttel, Ebstorferstr. 3.
Ostern 1956 bis Juni 1968	Schulzeit: Vier Jahre Volksschule in Bienenbüttel, anschließend Gymnasium, Wilhelm Raabe Schule, in Lüneburg mit Abitur als Abschluß im Juni 1968.
1968 - 1969	Arbeit als Praktikantin im klinischen Labor im Krankenhaus Bevensen
Juli 1969	Heirat des Medizinalassistenten Michael Zickendraht-Wendelstadt
Oktober 1969 bis September 1971	zweijährige Praktikantenzeit zur Ausbildung als Apothekerin, Nordsee-Apotheke, Hamburg.
September 1971	Pharmazeutisches Vorexamen
Oktober 1971 bis April 1975	Studium der Pharmazie an der Universität Hamburg mit Staatsexamen im April 1975
September 1974	verstarb mein Mann.
Juni 1975	Erteilung der Approbation als Apothekerin.
August 1975	Beginn der Dissertation am Botanischen Institut der Universität München unter Leitung von Prof.Dr.W.Rüdiger